



PCT/F 3 / 0 3 1 5 4

MAILED 06 JAN 2004

WIPO

PCT

# BREVET D'INVENTION

**CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION****COPIE OFFICIELLE**

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le **29 OCT. 2003**

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
www.inpi.fr



26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354\*03

## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 540 000 / 210502

<b>REMISE DES PIÈCES</b> DATE <b>30 OCT 2002</b> LIEU <b>75 INPI PARIS</b> N° D'ENREGISTREMENT <b>0213585</b> NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI <b>30 OCT. 2002</b>		<b>1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE</b>  CABINET ORES 6, avenue de Messine 75008 PARIS	
<b>Vos références pour ce dossier</b> (facultatif) VCstsF004/79FR			
<b>Confirmation d'un dépôt par télécopie</b>		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
<b>2 NATURE DE LA DEMANDE</b>		<b>Cochez l'une des 4 cases suivantes</b>	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N° _____ Date _____	
ou demande de certificat d'utilité initiale		N° _____ Date _____	
Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i>		<input type="checkbox"/> N° _____ Date _____	
<b>3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)</b>  PEPTIDES POUR LA PREVENTION, LE DIAGNOSTIC ET LE TRAITEMENT DE LA LEPTOSPIROSE ANIMALE ET/OU HUMAINE.			
<b>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
<b>5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)</b>		<input checked="" type="checkbox"/> <b>Personne morale</b> <input type="checkbox"/> <b>Personne physique</b>	
Nom ou dénomination sociale		VIRBAC	
Prénoms			
Forme juridique		S.A. à directoire et conseil de surveillance	
N° SIREN		_____	
Code APE-NAF		_____	
Domicile ou siège		1ère Avenue, 2065m, L.I.D.	
Rue			
Code postal et ville		06 51 6 CARROS	
Pays		FRANCE	
Nationalité			
N° de téléphone (facultatif)		N° de télécopie (facultatif)	
Adresse électronique (facultatif)			
<input checked="" type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»			

Remplir impérativement la 2<sup>ème</sup> page

REMISE DES PIÈCES DATE <b>30 OCT 2002</b> LIEU <b>75 INPI PARIS</b> N° D'ENREGISTREMENT <b>0213585</b> NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI	DB 540 17 / 210502
<b>6 MANDATAIRE</b> Nom Prénom Cabinet ou Société N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel Adresse Rue Code postal et ville Pays N° de téléphone (facultatif) N° de télécopie (facultatif) Adresse électronique (facultatif)		ORES Béatrice CABINET ORES 6, avenue de Messine 75 008 PARIS FRANCE 01 45 62 75 00 01 45 62 04 86 ores@cabinet-ores.com	
<b>7 INVENTEUR(S)</b> Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)	
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b> Établissement immédiat ou établissement différé		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation) <input checked="" type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence): AG	
<b>10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS</b> Le support électronique de données est joint La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input checked="" type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences <input checked="" type="checkbox"/>	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
<b>11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire) Béatrice ORES N°92-4046		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b> MME BLANCANEUX	



26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

**BREVET D'INVENTION**  
**CERTIFICAT D'UTILITÉ**  
Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354\*03

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**

Page suite N° 1.../1...



REMISE DES PIÈGES DATE <b>30 OCT 2002</b> LIEU <b>75 INPI PARIS</b> N° D'ENREGISTREMENT <b>0213585</b> NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI	
Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire		08 829 4 W / 010702	
Vos références pour ce dossier (facultatif)		VCstsF004/79FR	
<input checked="" type="checkbox"/> <b>DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____	
<input checked="" type="checkbox"/> <b>DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)</b>		<input checked="" type="checkbox"/> <b>Personne morale</b> <input type="checkbox"/> <b>Personne physique</b>	
Nom ou dénomination sociale		ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE NANTES	
Prénoms			
Forme juridique		Etablissement public à caractère administratif	
N° SIREN		_____	
Code APE-NAF		_____	
Domicile ou siège	Rue	Atlanpole La Chanterie Route de Gachet	
	Code postal et ville	44300 NANTES	
	Pays	FRANCE	
Nationalité			
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			
<input checked="" type="checkbox"/> <b>DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)</b>		<input type="checkbox"/> <b>Personne morale</b> <input type="checkbox"/> <b>Personne physique</b>	
Nom ou dénomination sociale			
Prénoms			
Forme juridique			
N° SIREN		_____	
Code APE-NAF		_____	
Domicile ou siège	Rue		
	Code postal et ville	_____	
	Pays		
Nationalité			
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			
<input checked="" type="checkbox"/> <b>SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)</b>		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b>	
Béatrice ORES N°92-4046		VIRE BLANCHEAUX	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.  
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI

La présente invention a pour objet des peptides susceptibles d'induire une protection contre les leptospiroses (notamment par voie vaccinale), des compositions immunogènes (réactifs diagnostiques et/ou thérapeutiques), comprenant un ou plusieurs de ces peptides ou les anticorps, acides nucléiques ou vecteur qui en  
 5 dérivent. Ces compositions sont particulièrement avantageuses puisqu'elles permettent d'induire une réponse ou une protection immune contre différentes souches pathogènes, notamment contre plusieurs sérogroupes pathogènes différents de leptospires et d'assurer un diagnostic commun à tous les cas cliniques quelle que soit l'espèce affectée.

10 Les leptospires pathogènes sont responsables de maladies infectieuses atteignant l'homme et l'animal. Les leptospiroses font partie des zoonoses surveillées par l'OMS du fait de leur répartition mondiale et de la gravité de la maladie (létale chez 2 à 20 % des malades en fonction de la précocité du diagnostic et du traitement). Chez l'animal, l'impact économique est important, la maladie étant  
 15 responsable de troubles de la reproduction chez les animaux d'élevage (ruminants ou porc) ou de signes cliniques graves altérant la santé de l'animal de compagnie qu'est le chien, ou celle de l'animal de sport qu'est le cheval.

L'importance des leptospiroses s'illustre notamment par deux aspects : tout d'abord leur impact en santé publique (hospitalisations, incapacités de  
 20 travail, parfois décès, mise en œuvre de vaccinations dans le cadre de la protection contre les maladies professionnelles dans certains pays dont la France), d'autre part leur impact économique (coût de mise en œuvre des programmes de santé publique, perte de production pour les animaux d'élevage et coût des vaccins employés dans de nombreux pays pour lutter contre cette baisse de production, perte affective de l'animal  
 25 de compagnie ou/et coût des vaccins disponibles actuellement chez le chien dans la quasi-totalité des pays du monde, et encore perte financière du fait de l'altération des performances sportives du cheval).

La lutte contre ces infections est particulièrement difficile, compte tenu de la complexité bactériologique de ces germes et de la diversité des réservoirs  
 30 que constituent les animaux de la faune sauvage, porteurs, excréteurs et disséminateurs de ces germes par leurs urines. La complexité bactériologique de ces bactéries est telle qu'actuellement coexistent deux classifications de ces germes : une classification sérologique et une classification génomique.

Selon la classification sérologique, toutes les souches pathogènes ont  
 35 été classées dans une même espèce pathogène *Leptospira interrogans s.l.* par opposition aux souches saprophytes aquacoles et classées dans *Leptospira biflexa s.l.* L'espèce *Leptospira interrogans* est divisée en plus de 25 sérogroupes différents, chacun de ces sérogroupes étant lui-même composé de plusieurs sérovars présentant

entre eux des communautés antigéniques suffisantes pour leur regroupement. On dénombre ainsi quelque 220 sérovars différents pour l'espèce pathogène. Cette classification est faite sur la base des antigènes inducteurs d'anticorps agglutinants, c'est pourquoi elle est encore la seule employée dans le cadre du diagnostic sérologique de l'infection.

5 Selon la classification génomique, fondée sur l'étude d'homologies génétiques, l'espèce pathogène *Leptospira interrogans* *sl* a été éclatée en espèces différentes dites genomospecies : *Leptospira interrogans sensu stricto* (*s.s.*), *Leptospira kirshneri*, *L. borgpetersenii*, *L. weilii*, *L. noguchii*, *L. santarosai*, *L. meyeri*,  
10 *L. fainei*....

L'expression clinique de la leptospirose est très polymorphe en fonction des souches infectantes mais aussi des espèces.

Ainsi, l'homme, sensible à la leptospirose, développe généralement des formes aiguës d'évolution rapide, avec atteinte hépatique, rénale ou pulmonaire. La précocité du diagnostic conditionne en général l'efficacité du traitement antibiotique.  
15 Le vaccin français dirigé contre *Icterohaemorrhagiae* n'assure une protection que contre ce séro groupe considéré comme le plus pathogène.

Chez le chien, espèce animale la plus sensible, une vaccination contre les deux sérogroupes considérés comme dominants dans cette espèce (*Icterohaemorrhagiae* et *Canicola*) a été mise en œuvre. Cependant, le vaccin ne protège que contre ces deux sérogroupes et ne permet pas d'éviter l'infection par une souche sauvage appartenant à un autre séro groupe. Ceci explique le développement de troubles chroniques, encore mal identifiés par les vétérinaires praticiens jugeant qu'un chien vacciné contre "la" leptospirose ne peut développer une forme chronique liée à  
25 une infection par une souche sauvage.

Chez le cheval, très exposé du fait de ses conditions d'entretien, de rares formes aiguës mais aussi des formes non caractéristiques telles que des baisses de forme, des contre performances sportives apparaissent. Certains avortements de cette espèce sont également liés à l'infection leptospirosique. Enfin, une affection oculaire récidivante est attribuée aux suites de l'infection par les leptospires. Cette affection compromettant l'avenir de l'animal par la cécité qu'elle peut entraîner est d'ailleurs inscrite en France sur la liste des vices rédhibitoires.  
30

Chez les ruminants et le porc, la leptospirose s'exprime essentiellement par des troubles de la reproduction, comprenant soit des avortements, soit de l'infertilité, troubles dont le poids économique peut être estimé suffisamment important pour que certains pays mettent en place à grande échelle des mesures de vaccination et/ou d'éradication.  
35

Compte tenu de l'importance et de la diversité des formes pathologiques, toute suspicion de leptospirose, qu'il s'agisse d'un cas clinique individuel ou d'un problème d'élevage, fait généralement l'objet de méthodes de confirmation expérimentale. Deux volets du diagnostic (et dépistage) peuvent ainsi être nécessaires, en fonction de la durée d'évolution de la maladie. Dans les cas aigus, la mise en évidence directe du germe est primordiale. Dans les cas chroniques, la mise en évidence de façon indirecte par la réponse sérologique est généralement suffisante en terme de diagnostic, mais, dans un deuxième temps, la reconnaissance des animaux porteurs de germes, et donc excréteurs, nécessite la mise en évidence du germe.

Actuellement, la mise en évidence directe de l'agent pathogène du germe peut être effectuée essentiellement par deux méthodes : l'isolement et la PCR.

L'isolement bactériologique est une méthode très lourde. La fragilité naturelle des leptospires fait que seuls les prélèvements traités dans un délai restreint permettent l'éventuel isolement d'une souche de leptospires. Il faut noter que la probabilité d'isoler un leptospire est en général faible, étant données les exigences de ces germes ; en outre le délai de réponse peut aller jusqu'à plusieurs semaines compte tenu de la lenteur de développement des cultures.

La PCR s'est donc révélée un outil beaucoup plus intéressant en terme de diagnostic. Cependant, cette méthode n'est actuellement développée que chez l'Homme, pour lequel elle est mise en œuvre à partir d'un prélèvement sanguin sur le malade en phase aiguë. La réalisation de la PCR comme méthode de diagnostic sur des tissus comme des produits d'avortement n'est encore qu'au stade de l'expérimentation. Quant au dépistage des animaux excréteurs de leptospires par l'analyse des urines, méthode qui serait utile en élevage, elle n'est pas actuellement opérationnelle.

Le diagnostic sérologique du germe, consistant à mettre en évidence des anticorps témoins d'une infection, est généralement effectué par le test de Microagglutination (MAT) qui est actuellement la méthode de référence. Les inconvénients de cette méthode sont liés à l'hétérogénéité bactériologique des leptospires. La méthode requiert l'utilisation de germes vivants (dont la culture est délicate) et par ailleurs, repose sur la mise en évidence d'anticorps agglutinants induits par les antigènes de surface des leptospires, antigènes qui ont servi à leur classification et donc expriment l'hétérogénéité de ces bactéries. Ceci signifie que la mise en œuvre du diagnostic sérologique nécessite que le sérum du malade soit mis en contact avec une souche vivante représentative de chacun des sérogroupes différents, ce qui oblige à multiplier les manipulations pour un même sérum.

Sur le plan de la protection, il a toujours été considéré dans l'art antérieur que seules les bactéries entières sont susceptibles d'apporter les antigènes protecteurs et par ailleurs qu'il n'existe pas de protection croisée entre des sérogroupes

différents. Ce qui signifie qu'actuellement, les vaccins commercialisés sont composés d'une suspension ou plus exactement d'une addition de suspensions de bactéries représentatives de chacun des sérogroupes nécessaires à la protection de l'espèce de destination du vaccin. Compte tenu de la grande diversité des sérogroupes, un choix s'impose en fonction de l'espèce et des conditions épidémiologiques. Ainsi, les vaccins usuels utilisés chez le chien associent une suspension de bactéries inactivées du séro groupe Icterohaemorrhagiae et une du séro groupe Canicola. Des vaccins utilisés chez le porc et les ruminants aux USA associent des suspensions de sérovars appartenant aux sérogroupes : Icterohaemorrhagiae, Pomona, Grippotyphosa, Canicola et Sejroë (séovar hardjo) par exemple. Le vaccin à usage humain commercialisé en France à l'heure actuelle comporte le séro groupe Icterohaemorrhagiae etc...

Le problème de ces préparations vaccinales est leur défaillance en termes de protection totale contre la leptospirose. Un individu vacciné dont la vaccination est entretenue selon les modalités prescrites par les producteurs de vaccin est protégé contre l'infection et/ou la maladie induite par une souche sauvage appartenant aux seuls sérogroupes présents dans le vaccin. On ne protège donc (et encore cette protection peut-elle être imparfaite) que contre l'infection par un ou plusieurs sérogroupes donnés, représentés dans la préparation vaccinale.

Cependant dans des travaux précédents (Gitton X, André-Fontaine G, André F, Ganière J-P. « Immunoblotting study of the antigenic relationships among eight serogroups of *Leptospira*." *Vet Microbiol* 1992 ; 32:293-303.), nous avons déterminé des antigènes communs à tous les leptospires pathogènes capable d'induire une protection croisée entre plusieurs sérogroupes selon la démarche suivante.

Ainsi, dans une première étape, il a été démontré que la présence de corps bactériens entiers n'était pas indispensable à l'induction d'une protection homologue. On entend par réponse ou protection homologue, la protection induite par une préparation composée par les leptospires appartenant au même séro groupe que les leptospires employés dans l'épreuve virulente réalisée sur animal de laboratoire sensible et permettant d'apprécier l'efficacité et l'authenticité de la protection conférée. Ceci a été démontré par immunisation d'animaux avec un extrait total de leptospires obtenu par éclatement des bactéries. Dans une seconde étape, il a été démontré que des extraits totaux de différents sérogroupes permettaient d'induire une protection hétérologue à l'intérieur de l'espèce *L. interrogans* *sl*. On parle de protection hétérologue lorsque l'épreuve virulente ("challenge") est réalisée avec une souche n'appartenant pas au séro groupe utilisé pour l'immunisation. Ceci a été démontré par des immunisations réalisées avec des extraits totaux de cultures des sérogroupes Autumnalis, Canicola ou Icterohaemorrhagiae suivies d'épreuves virulentes utilisant des souches Icterohaemorrhagiae ou Canicola dont la virulence est entretenue au



laboratoire. La troisième étape a consisté à démontrer que l'antigène ou les antigènes responsables de cette protection croisée étaient absents de, ou très peu exprimés par, l'espèce saprophyte: un extrait total de *L. biflexa* n'a pas permis de protéger des animaux contre une épreuve virulente. La quatrième étape a consisté à identifier les

5 antigènes différenciant l'espèce pathogène de l'espèce saprophyte : Pour cela, des comparaisons de profils électrophorétiques ou d'immunotransferts d'extraits totaux de leptospires de différents sérogroupes pathogènes ou non ont été réalisées et montrent des bandes antigéniques s'échelonnant de 14 à 200 kD dont 24 sont communes à l'espèce pathogène et en particulier la zone 21-26 kD qui est séro groupe-spécifique

10 (Gitton X, André-Fontaine G, André F, Ganière J-P. « Immunoblotting study of the antigenic relationships among eight serogroups of *Leptospira*." *Vet Microbiol* 1992 ; 32:293-303.). Des immunotransferts d'extraits totaux reconnus par des sérums de chiens infectés ont été réalisés ; ceci a permis de montrer que la zone 21-31 kD et plus particulièrement 25-31, 32-34 et 45 kD seraient associés à l'appartenance à

15 l'espèce pathogène, la zone antigénique différenciant l'espèce pathogène de l'espèce saprophyte se situait donc entre 21 et 45 kD. (Gitton X, Buggin-Daubié M, André F, Ganière J-P, André-Fontaine G. « Recognition of *Leptospira interrogans* antigens by vaccinated or infected dogs ». *Vet Microbiol* 1994 ; 4:87-97.). Cependant l'utilisation d'un extrait total permettait la migration des antigènes protéiques mais également des

20 antigènes lipopolyosidiques. Or l'art antérieur définit ces derniers comme responsables de la protection contre la leptospirose. La cinquième étape devait donc apprécier le rôle respectif éventuel dans la protection croisée des antigènes lipopolyosidiques et des antigènes protéiques préparés séparément. Cette cinquième étape a défini la nature de l'antigène ou des antigènes responsables de cette protection croisée. Des extraits

25 purifiés de lipopolysaccharides (LPS) ont été préparés par la méthode d'extraction à chaud phénol-eau de Westphall. Ce mode de préparation permet d'obtenir la fraction lipopolyosidique (LPS) pure. L'extrait résiduel contient les protéines (simples ou complexes), mais aussi du LPS résiduel. Nous avons démontré que l'extrait pur LPS est responsable d'un puissant effet protecteur, mais exclusivement homologue. Ceci

30 confirme bien les données antérieures concernant l'absence de protection croisée entre sérogroupes. En effet, le LPS correspond aux structures antigéniques externes responsables de la production d'anticorps agglutinants utilisés comme base de la classification sérologique, mais aussi responsables de l'effet protecteur des préparations vaccinales. Selon l'art antérieur, il était donc nécessaire qu'un vaccin soit

35 capable d'induire la production d'anticorps agglutinants à des taux significatifs pour protéger un animal contre une infection par un leptospire homologue. La sixième étape a consisté à contrôler la capacité d'un extrait protéique d'une souche *Autumnalis* ou *Canicola* purifié de toute trace de LPS d'induire une protection homologue au

même titre que le LPS purifié mais aussi d'induire une protection contre une épreuve virulente hétérologue observée lors des essais précédents avec des extraits totaux. Ceci a été réalisé par une immunisation avec un extrait protéique obtenu par une extraction chloroforme méthanol effectuée sur l'interface d'une extraction phénol eau ayant permis la purification préalable du LPS et suivie d'une épreuve virulente homologe ou hétérologue suivant le cas (Sonrier C, Branger C, Michel V, Ruvoen-Clouet N, Ganiere JP, Andre-Fontaine G. « Evidence of cross-protection within *Leptospira interrogans* in an experimental model. Vaccine ». 2000 Aug 15 ; 19(1):86-94.). Lors de la septième étape, il a été possible par l'utilisation du Prep-cell de Biorad de séparer différentes protéines ségrégeant dans cette zone afin de réaliser leur séquençage. Trois bandes ont fait l'objet de l'étude en séquençage, une protéine de 32 kD et deux protéines de 34 kD. Les séquences NH<sub>2</sub> terminales ont été définies ainsi qu'une séquence interne d'une douzaine d'acides aminés correspondant au pic majeur (pic 14) obtenu en HPLC. La protéine de 32 kD a été désignée PPL. Dans une huitième étape, des sondes nucléotidiques dégénérées ont été construites, le gène de PPL a été cloné, et la production de protéine PPL recombinante a été effectuée et a permis la production d'anticorps monoclonaux. Le gène PPL a été inséré dans un adénovirus humain non répliquatif et une protection efficace contre des épreuves virulentes effectuées sur la gerbille, a été observée après administration de ces virus recombinants en particulier comme vaccins (Branger C, Sonrier C, Chatrenet B, Klonjowski B, Ruvoen-Clouet N, Aubert A, Andre-Fontaine G, Eloit M. « Identification of the hemolysis-associated protein 1 as a cross-protective immunogen of *Leptospira interrogans* by adenovirus-mediated vaccination. » *Infect Immun.* 2001 Nov ; 69(11) : 6831-8.).

Toutefois, la protéine recombinante produite par un système procaryote ne permet pas d'apporter de protection significative contre les différentes souches de leptospires pathogènes.

Par ailleurs, le diagnostic sérologique des leptospiroses par le test de microagglutination est tardif et ne permet pas une détection précoce de la maladie. Il n'est pas rare qu'un animal meure de leptospire avant que celle-ci soit diagnostiquée.

Les inventeurs se sont donc fixé pour objectifs l'identification de peptides susceptibles d'induire une protection efficace contre les différentes souches de leptospires pathogènes, cette protection pouvant être induite de façon directe, sans passer par l'expression de ces peptides dans un adénovirus.

Les inventeurs se sont également fixé pour objectifs la mise au point d'une méthode de détection précoce de l'infection par les différentes souches de leptospires pathogènes afin de permettre un diagnostic de leptospirose à un stade de l'infection où il est efficace d'administrer un traitement à l'individu.

La présente invention permet à présent de résoudre les inconvénients des différentes méthodes de vaccination, de dépistage, de diagnostic et de traitement, décrites dans l'art antérieur. La présente invention décrit en effet l'identification d'un motif antigénique de leptospire : le peptide PP, commun à de multiples sérogroupes de leptospires, notamment de leptospires pathogènes. La présente invention permet également la production de polypeptides, peptides et anticorps, utilisables soit dans des approches vaccinales soit dans des approches thérapeutiques efficaces et susceptibles d'induire une protection contre de multiples sérovars de leptospires pathogènes. La présente invention permet ainsi la réalisation de tests de détection ou de dépistage des leptospires pathogènes eux-mêmes ou de l'infection qu'ils provoquent, non restreints à des sérovars particuliers. La présente invention permet en outre la réalisation de tests de détection plus simples que les méthodes MAT décrites dans l'art antérieur, puisqu'elles ne nécessitent pas la culture de germes. La présente invention décrit en outre des acides nucléiques, vecteurs, sondes, amorces ainsi que des cellules recombinantes utilisables pour la production des polypeptides, peptides ou protéines ou pour la détection de leptospires ou de leurs produits dans tout échantillon test, biologique (par exemple fluides biologiques tels que sang, plasma, urine, lait, liquide céphalorachidien, tissu, organe, culture cellulaire, etc.) ou d'autre origine (comme par exemple un échantillon souillé par des matières biologiques, telles qu'une eau de rivière, une eau stagnante, une eau de boisson, une eau stockée utilisées par des entreprises telles que des ardoisières, des maraîchers, etc.

Le premier objet de l'invention est un peptide dénommé PP, fragment d'une protéine PPL de 32 kDa décrite dans la Demande Internationale WO96/36355. Ce peptide PP est constitué de 25 acides aminés et est représenté par la séquence SEQ ID N°: 1 représentée ci-dessous :

SEQ ID NO : 1    Lys-Ala-Lys-Pro-Val-Gln-Lys-Leu-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Gly-Asp-Asp-Thr-Tyr-Lys-Glu-Glu-Arg-His-Asn-Lys

L'invention a également pour objet des homologues du peptide PP, ses sels pharmaceutiquement acceptables, ses fragments fonctionnels, ses analogues chimiques et certains dérivés chimiques de ce peptide.

Par homologues, on entend au sens de la présente invention des peptides dont la séquence d'acides aminés présente au moins 60% de similarité avec la séquence SEQ ID NO : 1, encore plus préférentiellement 70%, encore plus préférentiellement encore 80%, de manière préférée au moins 90%, et encore plus

favorablement au moins 95%, ou mieux, 98% de similarité avec la séquence SEQ ID NO : 1.

Par similarité de X% entre un peptide P et la séquence SEQ ID NO : 1, on entend que : lorsque la séquence de P est alignée face à  
 5 SEQ ID NO : 1, dans le même sens, X% des acides aminés de P sont identiques à l'acide aminé correspondant de SEQ ID NO : 1 ou sont remplacés par un acide aminé de même classe, étant entendu que si les séquences ne sont pas de même longueur, on placera éventuellement un espace entre les acides aminés de la séquence concernée. Le degré d'homologie peut être évalué par des méthodes bien connues de l'homme du  
 10 métier (par exemple, WILBUR W.J. et al Proceedings of the National Academy of Sciences USA 80, 726-730 (1983); MYERS et al, *Comput. Appl. Biosci.* 4, 11-17 (1988)).

Au sens de la présente invention l'homologie avec la SEQ ID NO : 1 s'étend aux peptides comportant de 15 à 40 acides aminés et dont la séquence, une fois  
 15 alignée avec SEQ ID NO : 1, avec les espaces placés entre les acides aminés appropriés, possède une similarité comprise dans les valeurs indiquées ci-dessus. Préférentiellement, l'homologie s'étend aux peptides comportant de 20 à 30 acides aminés, encore plus préférentiellement de 22 à 28 acides aminés.

Par acides aminés de même classe, on entend un acide aminé  
 20 possédant des propriétés chimiques sensiblement identiques.

En particulier, on entend par ce terme des acides aminés ayant sensiblement la même charge, et/ou la même hydrophilie ou hydrophobie, et/ou la même aromaticité.

De tels regroupements d'acides aminés incluent généralement :

- 25 (i) glycine, alanine, valine,
- (ii) isoleucine, leucine,
- (iii) tryptophane, tyrosine, phénylalanine,
- (iv) acide aspartique, acide glutamique,
- (v) arginine, lysine, histidine,
- 30 (vi) asparagine, glutamine,
- (vii) sérine, thréonine.

D'autres substitutions d'acides aminés peuvent être envisagées au sens de la présente invention dans lesquelles on remplace un acide aminé par un autre acide aminé de même classe, c'est-à-dire possédant des propriétés comparables,  
 35 l'acide aminé de substitution étant un acide aminé non naturel.

C'est le cas, par exemple, des énantiomères et des diastéréoisomères des acides aminés naturels, de l'hydroxyproline, de la norleucine, de l'ornithine, de la

citruline, de la cyclohexylalanine, des acides  $\beta$ -aminés tels que l'acide 3-amino-propionique, des acides  $\Omega$ -aminés tels que l'acide 4-amino-butyrique. De tels acides aminés sont bien connus de l'homme du métier et peuvent être préparés par des méthodes connues. Sont également incluses dans la présente invention les substitution  
 5 d'un ou plusieurs acides aminés par un acide aminé non naturel porteur d'un groupement permettant la détection du peptide, tels qu'un acide aminé porteur d'un groupement fluorescent, photoactivable ou un acide aminé radiomarqué.

Un exemple particulier d'homologue est constitué par les fragments fonctionnels des peptides selon l'invention : ce sont des peptides répondant à l'une des  
 10 séquences selon l'invention dans lesquelles un ou plusieurs acides aminés sont ôtés de la séquence mais qui conservent une activité immunogéniques comparable à celle décrite pour le peptide PP, en particulier un titre en anticorps comparable. Les fragments fonctionnels préférés des peptides selon l'invention sont ceux pour lesquels au plus six acides aminés, plus préférentiellement 4 acides aminés, plus  
 15 préférentiellement encore 2 acides aminés, sont ôtés. Encore plus préférentiellement, ceux pour lesquels un acide aminé est ôté.

Habituellement, des substitutions d'acides aminés de même classe permettent de conserver au peptide son activité immunogènes. Des substitutions appropriées pourront être déterminées en testant les propriétés antimicrobiennes des  
 20 peptides obtenus en utilisant des tests d'activité tels que ceux décrits ci-après. L'invention concerne plus spécifiquement des molécules induisant un titre en anticorps et/ou conférant une protection comparables à ceux susceptibles d'être obtenus par l'utilisation du peptide PP.

Selon l'invention, le terme sels se rapporte à la fois aux sels d'amine  
 25 d'une fonction carboxyle de la chaîne peptidique aussi bien qu'aux sels acides d'addition à un groupe amine de cette même chaîne polypeptidique. Les sels d'une fonction carboxyle peuvent être formés avec une base inorganique ou organique. Les sels inorganiques incluent par exemple les sels de métaux alcalins tels que les sels de sodium, de potassium et de lithium ; les sels alcalino-terreux tels que par exemple les  
 30 sels de calcium, de barium et de magnésium ; les sels d'ammonium, les sels ferreux, ferriques, les sels de zinc, de manganèse, d'aluminium, de magnésium. Les sels avec des amines organiques incluent ceux formés par exemple avec la triméthylamine, la triéthylamine, la tri(n-propyl)amine, la dicyclohexylamine, la triéthanolamine, l'arginine, la lysine, l'histidine, l'éthylènediamine, la glucosamine, la méthylglucamine,  
 35 les purines, les pipérazines, les pipéridines, la caféine, la procaine.

Les sels d'addition acides incluent, par exemple, les sels avec des acides minéraux tels que par exemple l'acide chlorhydrique, l'acide bromhydrique,

l'acide sulfurique, l'acide phosphorique, l'acide nitrique ; les sels avec des acides organiques tels que par exemple, l'acide acétique, l'acide oxalique, l'acide tartrique, l'acide succinique, l'acide maléique, l'acide fumarique, l'acide gluconique, l'acide citrique, l'acide malique, l'acide ascorbique, l'acide benzoïque.

- 5 Des dérivés chimiques des peptides selon l'invention incluent les composés des-alpha amino peptides, les dérivés N-alpha acyl substitués de la forme RCO-, dans laquelle R représente un groupement alkyle, alcényle, alcynyle, aryle ou aralkyle, linéaire, ramifié, ou cyclique comprenant de 1 à 50, préférentiellement de 1 à 8 atomes de carbone. Le groupement N-alpha acyle préféré est le groupement acétyle.
- 10 De tels substituants amine-terminaux peuvent augmenter l'activité du peptide en ralentissant ou en empêchant la dégradation enzymatique des peptides *in vivo*.

- D'autres dérivés chimiques des peptides selon l'invention incluent les dérivés substitués sur la fonction acide C-terminale par un groupement choisi parmi -NH<sub>2</sub>, les alkyloxy, alkylthio ou alkylamino de la forme -OR, -SR or -NHR, dans
- 15 lesquels R peut représenter une chaîne alkyle, alcényle, alcynyle, aryle ou un groupement aralkyle, linéaire, ramifié ou cyclique comprenant de 1 à 50, préférentiellement de 8 à 50 atomes de carbone.

- Une autre sorte de dérivé chimique des peptides selon l'invention inclut les dérivés porteurs d'un substituant pharmacophore, tel qu'un groupement
- 20 fluorescent, un groupement photoactivable, un groupement radiomarké ou tout autre groupement permettant la détection par spectroscopie et l'évaluation quantitative du peptide selon l'invention dans un échantillon biologique sans dégradation de l'échantillon biologique.

- Préférentiellement, selon l'invention, les acides aminés dont sont
- 25 constitués les peptides sont des énantiomères L. Toutefois, un ou plusieurs acides aminés de la séquence peptidique peut être remplacé par son énantiomère D.

- Au titre des analogues chimiques, dans les peptides selon l'invention, une ou plusieurs liaisons amides peptidiques (-CO-NH-) peuvent être remplacées par une liaison isostère telle que : -CH<sub>2</sub>NH-, CH<sub>2</sub>S-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH=CH- (cis et trans), -
- 30 COCH<sub>2</sub>-, -CH(OH)CH<sub>2</sub>- et -CH<sub>2</sub>SO-. Cette substitution peut être faite par des méthodes bien connues de l'homme du métier (on peut se reporter par exemple à : SPATOLA, Vega Data, Vol.1, issue 3 (1983); SPATOLA, Chemistry and Biochemistry of Amino Acids Peptides and Proteins, Weinstein, ed., Marcel Dekker, New York, p.267 (1983). MORLEY.J.-S., Trends Pharm. Sci., 463-468 (1980);
- 35 HUDSON et al, Int. J. Pept. Prot. Res. 14, 177-185 (1979); SPATOLA et al, Life Sci., 38, 1243-1249 (1986); Hann, J.Chem. Soc. Perkin Trans.I 307-314 (1982); ALMQUIST et al, J. Med. Chem., 23, 1392-1398 (1980); JENNINGS-WHITE et al,

EP-45665 ; HOLLADAY et al, Tetrahedron Lett. 24, 4401-4404 (1983) . HRUBY et al, Life Sci. 31, 189-199 (1982)).

Des dérivés des peptides selon l'invention incluent des polymères de ces peptides, plus préférentiellement des dimères de ces peptides via par exemple un groupement thiol de cystéine ou des oligomères par greffage de peptides sur des polylysines (MAP), ou couplage de ces peptides à des protéines porteuses (BSA, KLH, Toxines, etc.), ou à des chaînes lipidiques.

Les peptides objets de la présente invention peuvent être aisément obtenus par tous moyens connus de l'homme du métier, notamment par voie de synthèse.

L'invention a également pour objet des peptides comprenant une séquence SEQ ID NO : 1 ou des peptides comprenant un fragment fonctionnel de ces peptides, un homologue, un analogue chimique de ces peptides ou un dérivé chimique de ces peptides. En effet, les acides aminés terminaux, du peptide PP comportent, pour l'un, une fonction amine terminale libre, et pour l'autre, une fonction carboxyle terminale libre, ces deux fonctions étant chacune susceptibles d'être engagées dans une liaison peptidique avec l'acide C - terminal, respectivement l'amine N - terminale d'un autre fragment de peptide. De préférence, ces peptides comportent au plus 100 acides aminés, préférentiellement au plus 80 acides aminés, encore plus préférentiellement au plus 60 acides aminés et de façon avantageuse au plus 40 acides aminés.

Le caractère immunogène des polypeptides ou peptides de l'invention peut être vérifié de différentes manières connues de l'homme du métier. Ainsi, les polypeptides peuvent être mis en contact avec des anticorps (ou sérum de sujets infectés), la mise en évidence de complexes antigènes-anticorps indiquant la capacité des polypeptides de l'invention de porter des épitopes ou des fragments immunogènes.

Un autre objet de l'invention concerne des anticorps dirigés spécifiquement contre une protéine, un polypeptide ou un peptide selon l'invention. Il s'agit préférentiellement d'anticorps anti-leptospire, liant un épitope présent dans une protéine, un polypeptide ou un peptide selon l'invention. Les anticorps de l'invention sont préférentiellement spécifiques des leptospires, notamment pathogènes, bien qu'une liaison plus faible (ou non-spécifique) puisse être observée expérimentalement avec d'autres antigènes.

Les anticorps selon l'invention peuvent être des anticorps polyclonaux ou monoclonaux. Ils sont généralement produits par immunisation d'un animal avec un peptide, un polypeptide ou une protéine, selon l'invention et récupération du sérum, du lait ou de l'œuf s'il s'agit d'oiseaux (pour obtenir les

anticorps polyclonaux) ou de cellules du thymus ou de la rate, pour la production d'hybridomes produisant des anticorps monoclonaux.

Les anticorps selon l'invention sont plus préférentiellement des anticorps reconnaissant le peptide PP de séquence SEQ ID NO : 1 telle que définie ci-avant, un fragment fonctionnel de celui-ci, un homologue, un analogue chimique ou un dérivé chimique de celui-ci.

Les anticorps de l'invention possèdent avantageusement la capacité de reconnaître au moins deux souches de leptospire pathogènes appartenant à des sérogroupes différents, plus préférentiellement au moins 3 souches pathogènes de leptospire, en particulier appartenant à des espèces génomiques différentes.

Selon un mode de réalisation particulier, les anticorps selon l'invention sont des anticorps polyclonaux préparés par immunisation d'un animal avec le peptide PP. L'animal peut être un rongeur (rat, souris, gerbille, hamster, cobaye...), un primate, un lapin, un porc, un cheval, un bovin, un oiseau, etc. Les anticorps polyclonaux sont généralement récupérés dans le sérum des animaux immunisés ou les œufs, selon des protocoles connus de l'homme du métier.

Selon un autre mode de réalisation particulier, les anticorps selon l'invention sont des anticorps monoclonaux préparés à partir d'hybridomes obtenus par fusion entre une cellule immortalisée (par exemple un myélome) et une cellule productrice d'anticorps prélevée chez un animal immunisé avec le peptide PP telle que définie ci-avant. L'animal peut être un rongeur (rat, souris, gerbille, hamster, cobaye...), un primate, un lapin, un porc, un cheval, un bovin, un oiseau, etc.

Les anticorps de l'invention, notamment les anticorps monoclonaux, peuvent en outre être humanisés, c'est-à-dire modifiés artificiellement pour comporter des régions de chaînes lourdes ou légères d'origine humaine.

L'invention concerne également des fragments ou dérivés de tels anticorps, par exemple des fragments Fab, F(ab')<sub>2</sub>, des ScFv (anticorps simple-chaîne), etc.

Comme il sera développé dans la suite du texte, les anticorps de l'invention peuvent être utilisés par exemple pour la détection de souches pathogènes de leptospires ou de produits sécrétés par ces mêmes leptospires dans des échantillons tests (notamment des prélèvements de sang, de lait, de liquide céphalorachidien ou d'urine), ou pour induire une protection (d'urgence) contre des infections par leptospire.

Un autre objet de l'invention réside dans tout acide nucléique codant un polypeptide, peptide ou une protéine tels que définis ci-avant. Les acides nucléiques peuvent être des ADN ou des ARN, notamment des ADN recombinants, génomiques, synthétiques ou semi-synthétiques ou encore des ARNm, ou des



fragments ou dérivés de ceux-ci. Les acides nucléiques peuvent être obtenus à partir de banques, clonés à partir de bactéries leptospires (notamment par PCR), produits par synthèse artificielle en utilisant des synthétiseurs d'acides nucléiques, ou encore préparés en utilisant des combinaisons de ces méthodes (digestions enzymatiques, ligatures, clonage, modifications, etc.). Les acides nucléiques peuvent en outre être modifiés pour améliorer l'usage des codons, éliminer des promoteurs cryptiques, réduire des structures secondaires, etc.

L'invention concerne également des vecteurs comprenant un acide nucléique tel que défini ci-avant. Il peut s'agir d'un vecteur de type plasmide, cosmide, épisome, chromosome artificiel, phage, virus, etc. Il s'agit plus préférentiellement d'un plasmide, par exemple d'un plasmide réplcatif ou intégratif chez les bactéries ou cellules eucaryotes (levures, cellules de mammifères, d'oiseaux, d'insectes, etc.) ou d'un virus recombinant, notamment défectif (tel qu'un poxvirus, un adénovirus, un rétrovirus, un baculovirus, un herpesvirus, etc.).

Les vecteurs plasmidiques peuvent être préparés par les techniques conventionnelles en utilisant des plasmides disponibles dans le commerce, tels que pUC, pBR, pCN, etc.

L'invention concerne aussi toute cellule recombinante comprenant un acide nucléique ou un vecteur tels que définis ci-avant. La cellule recombinante peut être une bactérie (par exemple une souche de E.coli), ou une cellule eucaryote, notamment une levure, une cellule de mammifère, d'oiseau, ou d'insecte, etc. Les cellules recombinantes peuvent être utilisées notamment pour la production des polypeptides de l'invention, ainsi que comme modèles pour la recherche de composés susceptibles de neutraliser ou d'antagoniser l'activité du peptide PP.

L'invention concerne en outre tout organisme transgénique non humain, en particulier, tout mammifère non humain, tout oiseau, ou tout organisme végétal comprenant un acide nucléique tel que défini ci-avant dans ses cellules. Avantageusement, ces organismes transgéniques sont obtenus par recombinaison homologuc. De tels mammifères (rongeurs, canins, lapins, chèvre, porc, etc.) et végétaux sont notamment utilisables pour la production des polypeptides de l'invention et pour l'identification de composés à visée thérapeutique ou vaccinale, par exemple.

Un autre objet de la présente invention réside dans des sondes et/ou amorces nucléotidiques, utilisables pour la détection et/ou l'amplification d'acides nucléiques de leptospires, et notamment pour la détection de la présence d'une souche pathogène de leptospire ou de produit sécrété par celui-ci dans un échantillon test (notamment un produit biologique ou contaminé par un produit biologique).

Les sondes nucléotidiques selon l'invention comprennent avantageusement un acide nucléique tel que défini ci-avant. Elles sont préférentiellement simple-brin, et peuvent être marquées, par exemple par marquage radioactif, enzymatique, fluorescent, chimique, etc. Une sonde selon l'invention comprend préférentiellement une séquence complémentaire de tout ou partie de la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1 ou de l'un des peptides selon l'invention tels que définis ci-dessus. Les sondes de l'invention peuvent être utilisées pour détecter la présence d'une souche pathogène de leptospire ou de produit sécrété par celui-ci dans tout échantillon, notamment un échantillon biologique. En effet, elles sont préférentiellement (i) spécifiques des souches pathogènes de leptospire et (ii) réactives avec des sérovars différents et des espèces génomiques différentes de leptospires pathogènes. Une sonde préférée selon l'invention comprend la séquence complète de la séquence nucléotidique codant PP, ou un fragment de celle-ci.

Les amorces nucléotidiques selon l'invention sont des oligonucléotides, d'une taille généralement inférieure à 40 bases, comprenant la séquence d'un acide nucléique tel que défini ci-avant. Les amorces sont utilisables pour l'amplification d'acides nucléiques de Leptospires, notamment pour l'amplification de la séquence codant PP ou d'une partie de celui-ci, par exemple par réaction PCR.

L'invention concerne plus particulièrement tout couple d'amorces permettant l'amplification d'une région de la séquence codant PP tel que défini ci-avant. Préférentiellement, la région amplifiée comporte au moins 50 pb.

Les sondes, amorces ou oligonucléotides de l'invention sont préférentiellement complémentaires d'une région au moins de la séquence codant PP. La complémentarité est généralement parfaite, de manière à assurer une meilleure sélectivité d'hybridation. Toutefois, certains mésappariements peuvent être tolérés. Ces sondes ou oligonucléotides peuvent être synthétisés par toute technique connue de l'homme du métier, par exemple par clivage à partir des acides nucléiques décrits ci-avant, ou par synthèse artificielle, ou en combinant ces techniques. Les sondes et amorces sont particulièrement utiles pour la détection de la présence de souches pathogènes de leptospires, et/ou le diagnostic de leptospiroses, comme il sera détaillé ci-après.

Diverses équipes travaillent sur l'amélioration des antigènes de diagnostic indirect de la leptospirose, le but étant d'aboutir à des méthodes opérationnelles, facilement utilisables en particulier dans les pays non industrialisés, victimes majeures de ces pathologies. Les produits actuellement proposés sur le marché sont des extraits complexes de cultures de leptospires. Cette complexité

reproduit celle des souches vivantes utilisées dans le MAT et n'apporte donc pas d'amélioration sensible en terme de reproductibilité et de praticabilité.

La mise en évidence d'anticorps dirigés contre un antigène spécifique des souches pathogènes est donc particulièrement avantageuse. La présente invention peut ainsi être utilisée sur le plan diagnostique, vaccinal, thérapeutique et/ou expérimental.

Sur le plan du diagnostic indirect, compte tenu de sa présence dans ou de sa sécrétion par les souches pathogènes, le peptide PP de l'invention peut être utilisé comme motif antigénique capable de mettre en évidence des anticorps produits lors d'une infection par une souche pathogène, quel que soit son sérotype d'appartenance. Ceci permet donc que le diagnostic expérimental de la leptospirose puisse être assuré par de nombreux laboratoires disposant d'un équipement ordinaire (exemple ELISA ou dot) alors que le MAT exige en entretien de cultures vivantes et que sa standardisation, de ce fait, est très difficile.

Un objet particulier de l'invention réside donc dans l'utilisation d'un polypeptide, peptide ou d'une protéine tels que définis ci-avant pour détecter *in vitro* la présence d'anticorps anti-leptospire dans un échantillon biologique test (notamment un échantillon biologique tel que sang, sérum, lait, urine, tissu, etc. ou non biologique tel que eau, etc.). Un autre objet de l'invention réside dans une méthode *in vitro* de détection de la présence d'anticorps anti-leptospire dans un échantillon test, cette méthode comprenant la mise en contact de cet échantillon (ou une dilution) avec un polypeptide, peptide ou une protéine tels que définis ci-avant, et la mise en évidence de la formation de complexes antigène-anticorps.

Sur le plan du diagnostic direct, les anticorps (ou fragments ou dérivés d'anticorps) selon l'invention, notamment les anticorps monoclonaux de l'invention, permettent la mise en évidence directe de l'agent pathogène ou de produits sécrétés présents dans un échantillon test (tel qu'un prélèvement biologique ou un autre type d'échantillon tel que de l'eau). La mise en évidence peut être réalisée par toute méthode immunologique connue de l'homme du métier, telle que par ELISA capture, RIA, essais directs ou sandwich, etc., ou par révélation immunologique de ce peptide dans les prélèvements pathologiques ou non.

Un autre objet de l'invention réside donc dans l'utilisation d'un anticorps (ou fragment ou dérivés d'anticorps) selon l'invention, notamment d'un ou plusieurs anticorps monoclonaux de l'invention, pour la détection de la présence d'une souche pathogène de leptospire ou de ses produits sécrétés dans un échantillon, notamment biologique. Un autre objet de l'invention réside dans une méthode de détection de la présence d'une souche pathogène de leptospire ou de ses produits sécrétés dans un échantillon, comprenant la mise en contact de cet échantillon (ou une

dilution, ou une concentration) avec un anticorps (ou fragment ou dérivés d'anticorps) selon l'invention, et la mise en évidence de la formation de complexes antigène-anticorps.

Pour ces utilisations, les polypeptides, peptides, protéines et anticorps peuvent être utilisés sous forme soluble, ou immobilisés sur des supports solides ou semi-solides, de type filtre, silice, verre, plaque, bille, etc. L'utilisation sous forme immobilisée permet avantageusement de simplifier la détection ou le diagnostic expérimental de la leptospirose. Ces composés peuvent en outre être marqués, par exemple au moyen de marqueurs fluorescents, enzymatiques, biologiques ou radioactifs. Comme indiqué ci-avant, la révélation de complexes antigène-anticorps peut également être réalisée au moyen d'un anticorps supplémentaire marqué, ou selon les techniques immunologiques connues (ELISA, RIA, sandwich, capture, etc.).

Une autre méthode de détection (ou dépistage) selon l'invention réside dans la mise en contact d'un échantillon test avec une sonde nucléotidique de l'invention, et la mise en évidence d'une hybridation entre ladite sonde et ledit échantillon. Plus préférentiellement, l'échantillon test est traité préalablement de manière à rendre les acides nucléiques qu'il contient accessibles à une réaction d'hybridation. Le traitement peut consister à casser les membranes cellulaires, par exemple par traitement chimique (détergent) et/ou mécanique (ultra son, congélation-décongélation, etc.). A ce traitement, peuvent s'ajouter des méthodes de concentration (filtration, centrifugation, etc.) des prélèvements, notamment non biologiques tels que des échantillons d'eau. Dans un mode particulier de mise en œuvre, l'échantillon, notamment biologique, ainsi traité est soumis à une réaction d'amplification, au moyen d'amorces de l'invention, préalablement à la réaction d'hybridation avec la sonde. L'amplification peut être réalisée dans des conditions conventionnelles. L'hybridation peut être réalisée sur des supports, sur lesquels la sonde est immobilisée (filtres, verre, silice, etc.). Les conditions de stringence de l'hybridation peuvent être ajustées par l'homme du métier, en adaptant la température et/ou la salinité des milieux.

L'invention concerne en outre un kit pour la mise en œuvre des procédés de l'invention, comprenant une sonde ou un oligonucléotide ou un couple d'amorces tels que décrits ci-avant. Les kits de l'invention comprennent avantageusement les réactifs appropriés à une réaction d'amplification et/ou d'hybridation, et, éventuellement, un support pour de telles réactions (filtres, membranes, chips, etc.).

La présente invention est également utilisable sur le plan thérapeutique et préventif. En effet, bien que le mode d'action pathogénique du peptide PP ne soit pas encore défini, la présente demande montre qu'il est capable d'induire

une protection. L'administration des anticorps dirigés contre ce peptide, qu'ils soient d'origine poly ou monoclonale permet de neutraliser l'impact pathogénique des leptospires chez l'individu en cours d'évolution et donc d'améliorer le pronostic de cette maladie. De même, l'administration d'un polypeptide, peptide ou d'une protéine de l'invention, éventuellement sous forme inactivée, ou d'un acide nucléique ou vecteur correspondant, permet d'induire une réponse immune protectrice contre ces agents infectieux ou leurs effets.

L'efficacité des peptides de l'invention dans la détection précoce des leptospires pathogènes et l'induction d'une protection immunitaire contre ces mêmes leptospires est particulièrement remarquable, en particulier, du fait que la protéine PPL dont ils sont issus ne permet pas d'obtenir une immunisation de façon directe, sans passer par l'expression dans un adénovirus, et qu'elle ne permet pas non plus de détecter de façon précoce et spécifique la présence de souches de leptospires pathogènes dans un organisme humain ou animal.

En outre, il est bien connu de l'homme du métier que les peptides sont en règle générale faiblement immunogènes.

Dans des exemples qui sont destinés à illustrer l'invention, les propriétés remarquables suivantes du peptide PP sont illustrées :

Le peptide constitué de cette séquence ID N°1 est reconnu en ELISA par plusieurs anticorps monoclonaux contre la protéine PPL et en particulier 4D4H4E5 et 6E5A2F2 (Demande Internationale WO96/36355, Exemple 2).

On a également montré que le peptide PP, qu'il soit couplé ou non à une protéine porteuse, est très immunogène sur le modèle souris, lapin (Exemple 3) et gerbille (Exemple 7).

Dans un troisième temps, la réponse anticorps dirigée contre le peptide PP a été analysée sur les sérums de gerbilles immunisées par l'adénovirus-PPL. Une corrélation peut être observée entre la réponse immunitaire dirigée contre le peptide PP et la protection des animaux suite à l'immunisation par PPL via l'adénovirus ce qui conforte l'hypothèse d'un effet protecteur associé à la séquence de ce peptide (Exemple 6).

Dans un quatrième temps, le peptide PP a été couplé à la protéine porteuse KLH et une protection efficace contre une épreuve virulente a été observée sur la gerbille immunisée par PP-KLH (Exemple 7). Le peptide PP présente au moins un épitope protecteur dans sa séquence. Le peptide seul a permis d'induire une protection significative contre une épreuve virulente (exemple 7).

Dans un cinquième temps, l'efficacité discriminante du peptide PP comme antigène de diagnostic pour la leptospirose a été évaluée sur plusieurs espèces (homme, chien, bovin, cheval). Quelle que soit l'espèce considérée, le peptide PP se

révèle être un antigène capable de mettre en évidence une réponse immunitaire spécifique d'une infection par les leptospires pathogènes, et en particulier en phase précoce (Exemple 4).

Ces résultats démontrent que si les antigènes lipopolyosidiques sont bien le support d'une protection efficace vis-à-vis d'une infection homologue, point de départ de la constitution des préparations vaccinales employées actuellement tant chez l'homme que chez l'animal, le peptide PP, employé seul, est capable d'induire une protection croisée entre sérogroupes différents de l'espèce *Leptospira interrogans ss* (Icterohaemorrhagiae, Canicola, Autumnalis). La protection hétérologue est également induite entre espèces génomiques différentes de l'ancienne espèce *Leptospira interrogans sl* (ici *L. borgpetersenii* et *interrogans ss*), alors qu'il est absent de l'ancienne espèce saprophyte *Leptospira biflexa sl*.

La présente invention concerne donc l'utilisation du peptide PP, de ses fragments de synthèse ou naturels, de ses dérivés chimiques quels qu'ils soient, de ses homologues, de ses analogues chimiques, utilisés seuls ou associés à d'autres protéines ou fractions lipopolyosidiques dérivées de leptospires, ou à des adjuvants de l'immunité quelle que soit leur nature, pour la préparation d'une composition vaccinale à usage vétérinaire ou humain, notamment pour la préparation d'une composition destinée à induire une réponse immune protectrice contre des espèces et des sérovars différents de leptospires pathogènes.

L'invention a également pour objet une composition pharmaceutique, notamment un vaccin, comprenant un polypeptide ou un acide nucléique tels que définis ci-avant.

L'invention a encore pour objet une composition comprenant un ou plusieurs anticorps tels que décrits ci-avant, notamment pour induire une protection.

Les compositions immunogènes, vaccins ou anticorps de l'invention peuvent être utilisés sous forme injectable ou per os ou transcutanée, par exemple en association avec des véhicules acceptables sur le plan pharmaceutique ou vétérinaire, ou avec des adjuvants. Les quantités d'immunogènes administrées, et la fréquence ou le nombre des administrations peuvent être adaptés par l'homme du métier en fonction du sujet, du stade d'évolution de l'injection, etc. Typiquement, une ou deux injections, à 2 semaines d'intervalle, sont réalisées, avec des quantités adaptés à l'espèce par exemple 30 µg de peptide couplé à la protéine porteuse selon l'invention. Des injections supplémentaires peuvent être envisagées, ou des quantités supérieures peuvent être administrées, notamment dans le cas d'administrations orales.

Les compositions immunogènes ou des vaccins de l'invention présentent notamment les avantages suivants :

Efficacité : Induction d'une protection croisée évitant l'accumulation de préparations antigéniques différentes d'efficacité partielle afin de prévenir l'infection par les différentes souches infectantes présentes dans un pays donné pour une espèce donnée.

5                   Innocuité : L'utilisation d'un peptide de l'invention (couplé ou non à une protéine porteuse, ou des polypeptides, anticorps et acides nucléiques) évite d'introduire chez l'individu vacciné de nombreux antigènes non nécessaires à la protection, donc pour le moins inutiles, voire dangereux lors d'utilisations répétées. On pense ainsi que l'uvéite récidivante du cheval (pouvant aboutir à la cécité de l'animal)  
10 est induite par une réponse immunitaire post infectieuse due à des protéines de leptospires ayant une composition proche de certaines protéines structurales de l'œil du cheval. Par ailleurs, il semble que chez l'Homme les vaccinations répétées sont de moins en moins bien tolérées au cours du temps. De plus, aucune donnée de pharmacovigilance à long terme n'est disponible.

15                   Les compositions d'anticorps (polyclonaux, monoclonaux humanisés ou non) peuvent avantageusement éviter en urgence et passivement une évolution grave et/ou létale d'une leptospirose déclarée chez l'homme ou l'animal.

                  Compatibilité avec les mesures de prophylaxie sanitaire : actuellement, il est impossible de différencier les anticorps post-vaccinaux des  
20 anticorps post-infectieux, la production d'anticorps agglutinants étant obtenue dans les deux cas. Ce vaccin employé dans les grandes espèces de production (il n'en existe pas actuellement en France et ceux existant à l'étranger ont une efficacité difficile à démontrer) permettrait de mettre en œuvre une prophylaxie médicale permettant malgré tout le dépistage de l'infection sauvage et donc les qualifications de cheptels  
25 indemnes, qualifications valorisantes à l'exportation.

                  Limitation de l'usage des antibiotiques en élevage : l'absence de possibilités d'éradication des leptospires (entretenus dans l'environnement par de nombreuses espèces d'animaux réservoirs de la faune sauvage) oblige actuellement à mettre en œuvre un traitement antibiotique élargi à l'ensemble du troupeau quand des  
30 troubles cliniques ou des pertes économiques sont reconnus liés à l'infection leptospirosique. Ceci contribue donc à l'utilisation intensive des antibiotiques en élevage, usage discuté en terme de retombées pour la santé publique.

                  La production industrielle d'un tel vaccin devrait enfin être simplifiée par rapport aux vaccins de l'art antérieur puisqu'il n'est pas nécessaire de modifier la  
35 composition antigénique de la préparation vaccinale en fonction de l'espèce, ni des conditions épidémiologiques spécifiques des zones géographiques où elle serait appliquée.

L'invention concerne aussi les polypeptides, protéines et peptides tels que définis ci-avant, sous forme atténuée, c'est-à-dire conservant les propriétés immunogènes et essentiellement dépourvus d'autre activité biologique.

L'invention concerne également l'utilisation des acides nucléiques ou vecteurs tels que décrits ci-avant pour la production *in vitro* ou *ex vivo* des polypeptides, protéines et peptides de l'invention, quelles que soient les méthodes de recombinaison génétique employées : animaux transgéniques, bactéries, cellules eucaryotes, végétales, plasmides, virus, extraction de milieux de culture acellulaire etc. Les techniques de production de protéines recombinantes sont bien connues de l'homme du métier, et peuvent être appliquées à la présente invention (promoteurs forts, inductibles, signaux de terminaison, techniques de transfection, etc.).

Description des outils : identification d'un peptide (PP) à des fins d'utilisation comme vaccin, diagnostic et thérapeutique

La présente invention sera décrite en détail à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs

#### Légende des figures

Figure 1 : Réponse anticorps IgG<sub>1</sub> de 5 souris immunisées par le peptide PP couplé à la protéine porteuse KLH pour l'essai 1 et 2 exprimée en densité optique corrigée en fonction de la dilution.

Figure 2 : Réponse anticorps IgG<sub>2A</sub> de 5 souris immunisées par le peptide PP couplé à la protéine porteuse KLH pour l'essai 1 et 2 exprimée en densité optique corrigée en fonction de la dilution.

Figure 3 : Réponse anticorps IgG de lapin immunisé par le peptide PP exprimée en densité optique corrigée en fonction de la dilution.

Figure 4 : Comparaison de la Réponse anticorps IgM et IgG de sérums provenant de malades humains non atteints de leptospirose (confirmée par le MAT) mais atteints de la maladie de Lyme pour deux d'entre eux (sérum 151358 et 153272) contre le peptide PP et contre la protéine recombinante PPL exprimée en densité optique (DO).

Figure 5 : Réponse anticorps IgM et IgG de 5 sérums provenant de malades humains atteints de leptospirose confirmée ou non par le MAT contre le peptide PP exprimée en densité optique (DO).

Figure 6 : Réponse comparée PP et PPL, soit IgM, soit IgG, pour des sérums provenant de 4 chiens SPF dont trois sont vaccinés contre la leptospirose (CN V) exprimée en densité optique (DO).

Figure 7 : Réponse anticorps IgM et IgG de 7 sérums provenant de chiens, suspects cliniques (leptospirose confirmée par le MAT) comparée à celle de 3



chiens sains SPF vaccinés (3039, 3051, 3058) contre le peptide PP exprimée en densité optique (DO) ; les N° 210749 et 210750 proviennent d'un même animal prélevé à 4 jours d'intervalle (CN = chien).

5 Figure 8 : Réponse anticorps IgG de 4 sérums bovins issus de cheptels suspectés atteints de leptospirose contre le peptide PP exprimée en densité optique.

Figure 9 : Réponse anticorps IgG de 6 sérums équins contre le peptide PP exprimée en densité optique.

10 Figure 10 : Cinétique de la réponse anticorps contre le peptide PP exprimée en densité optique corrigée des gerbilles immunisées via l'adénovirus.

Figure 11 : Cinétique de la réponse anticorps IgG contre le peptide PP exprimée en densité optique corrigée en fonction de la dilution (A) ou du temps (B) de gerbilles immunisées par le peptide PP couplé à la protéine porteuse KLH.

15 Figure 12 : Courbe de survie de gerbilles immunisées par le peptide PP couplé à la protéine porteuse KLH et soumises à une épreuve virulente (EV) de leptospires de *Leptospira interrogans* sl sérovar canicola.

Figure 13 : Courbe de survie de gerbilles immunisées par PP-KLH ou PP et soumises à une EV de leptospires de *Leptospira interrogans* sl sérovar canicola.

20 Légende des tableaux

Tableau 1 : Titre MAT et EIA de 5 sérums provenant de malades humains atteints ou non de leptospirose.

25 Tableau 2 : Tableau de survie de gerbilles immunisées par la protéine recombinante PPL avec l'adjuvant de Freund après épreuve virulente canicola.

Tableau 3 : Tableau de survie de gerbilles immunisées par la protéine recombinante PPL adjuvée par l'hydroxyde d'alumine et le QS 21 après épreuve virulente canicola.

30 Tableau 4 : Tableau de mortalité de gerbilles immunisées par le peptide PP couplé à la protéine porteuse KLH après épreuve virulente de leptospires de *Leptospira interrogans* sl canicola.

Tableau 5 : Tableau de mortalité de gerbilles immunisées par le peptide PP couplé ou non à la protéine porteuse KLH après épreuve virulente canicola  $10^2$ .

35 Tableau 6 : Analyse statistique des essais vaccinations par le peptide PP couplé ou non selon le test de Logrank.

Légendes des séquences

Seq ID N° 1 : séquence peptidique PP

### Exemple 1 : Synthèse du peptide PP

Le peptide PP représenté dans la séquence SEQ ID N°1, est un peptide de 25 acides aminés qui correspond au fragment aa153-aa177 de la protéine PPL de *Leptospira interrogans* sl.

5 Le peptide ID N°1 de 25 acides aminés a été synthétisé par Neosystem.

Le peptide brut est purifié par HPLC.

L'homogénéité du peptide purifié est vérifiée en HPLC et la structure théorique est confirmée par mesure de la masse de ce peptide en spectrométrie de masse de type ES-MS, par rapport à celle calculée à partir de la séquence théorique en acides aminés de ce peptide.

Exemple 2 : identification du peptide PP contre des anticorps monoclonaux

Le peptide ID N°1 a été utilisé en ELISA. Il a été utilisé comme antigène d'adsorption (protocole diagnostic) avec comme anticorps primaires, différents anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine PPL, en particulier deux anticorps monoclonaux 6E5A2F2 et 4D4H4E5 et des sérums de gerbilles éprouvées par un challenge *Leptospira interrogans* ss sérovar canicola. Les deux anticorps monoclonaux ont reconnu ce peptide ce qui démontre qu'il possède un ou des épitopes immunogènes de la protéine PPL. Par ailleurs, les sérums polyclonaux de gerbilles ont permis de mettre en évidence la présence d'anticorps dirigés contre ce peptide dans une phase précoce après infection par des leptospires pathogènes chez la gerbille.

### Exemple 3 : Immunogénicité du peptide PP

#### 3-1 Immunogénicité du peptide PP couplé à la protéine porteuse

25 KLH

#### Couplage chimique pour obtenir PP-KLH

Dans cet exemple, le peptide utilisé correspond au peptide PP (SEQ ID NO : 1) auquel est ajouté un cystéine en position N-terminal. Le réactif hétérobifonctionnel, sulfo-m-Maleimidobenzoyl-N-hydrosuccimide ester (sulfo-MBS, Pierce) utilisé permet une activation des fonctions amine libres de la protéine porteuse KLH (keyhole-limpet-haemocyanin, Pierce), puis un couplage du peptide via la réaction du groupement sulfhydryl de la cystéine ajoutée à l'extrémité N-terminale du peptide avec la partie maléimide du réactif sulfo-MBS.

Brièvement la protéine porteuse KLH solubilisée dans de l'eau à une concentration de 10 mg/ml est activée à l'aide du réactif sulfo-MBS dilué dans du tampon de couplage (Phosphate sodique 83 mM, pH = 7,2, NaCl 0,9 mM, EDTA 0,1 M) à une concentration finale de 2 mg/ml. Celui-ci est ajouté à raison de 1 mg de réactif pour 10 mg de KLH, puis l'ensemble est placé sous agitation pendant 1 h à

l'obscurité à une température de 15 à 25°C. La protéine KLH est déssalée sur colonne NAP5 équilibrée par le tampon de couplage. L'élution de la protéine est réalisée à l'aide de ce tampon. Les fractions contenant la protéine KLH activée sont rassemblées. Pour le couplage, 8.5 mg de peptide (dans le tampon précédent à une concentration de 2 mg/ml) sont ajoutés à 10 mg de KLH (concentration de l'ordre de 5 mg/ml) dans un volume final de 6 ml. L'ensemble est placé sous agitation pendant 2 heures à une température de 15 à 25°C et à l'obscurité. Le conjugué est ensuite dialysé contre un tampon PBS (Phosphate sodique 20 mM pH = 7,4, NaCl 130 mM) : 3 dialyses successives de 2 fois 1 heure puis une nuit à 4°C avant dosage protéique. La préparation est ensuite répartie, à raison de 100 µg par tube eppendorf et congelée à -80°C.

#### Réponse anticorps contre le peptide PP chez la souris

Un protocole d'immunisation a été mis en œuvre pour évaluer la réponse immunitaire contre le peptide PP couplé à la KLH.

Un lot de 5 souris a été constitué. Deux injections ont été administrées à deux semaines d'intervalle par voie sous cutanée. La 1<sup>ère</sup> injection est constituée de 10 µg de peptide PP couplé à la KLH avec l'adjuvant complet de Freund sous un volume de 200 µl (v/v). La 2<sup>nde</sup> injection est constituée de 10 µg de peptide PP couplé à la KLH avec l'adjuvant incomplet de Freund sous un volume de 200 µl (v/v). Cet essai a été réalisé deux fois.

En parallèle, un lot de 5 souris ne recevant rien est utilisé comme témoin.

Une prise de sang a été réalisée deux semaines après la seconde injection pour contrôle sérologique.

Les anticorps anti-PP produits chez les souris sont dosés par une technique ELISA soit sur des prélèvements sérologiques individuels soit sur des pools de plusieurs sérums. L'adsorption de l'antigène PP s'effectue dans les plaques Immulon 4 (Dynatech) à raison de 500 ng de PP par puits dilué dans du tampon carbonate de sodium 10 mM, pH = 9,4.

Après une nuit à 4°C, les plaques sont lavées par du PBS contenant 0,2 % tween<sub>20</sub> puis saturées par une solution de BSA à 1 % dans du TNE (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4) pendant 60 min à 37°C. Après 3 lavages avec PBS tween, cent µl de sérum dilués dans du TNE contenant 0.1% de BSA sont déposés dans chaque cupule et incubés 60 min à 37°C. Après 5 lavages, les antiglobulines IgG1 ou IgG2A de souris couplées à la peroxydase diluées au 1/5000 dans la tampon TNE-0.1% BSA sont ajoutées à raison de 100 µl par puits et placées 60 min à 37°C. Après 5 lavages, la révélation est réalisée par adjonction de 100 µl par puits d'un tampon [citrate/ABTS] contenant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Après 10 min à une température de

15-25°C; la réaction est arrêtée par ajout d'une solution H<sub>2</sub>O/DMF (v/v) contenant 5 % de SDS à raison de 100 µl par cupule. La réaction colorée est lue au spectrophotomètre à 405 nm.

5 Les résultats de la réponse anticorps IgG<sub>1</sub> anti-PP exprimée en DO corrigée des essais d'immunisation 1 et 2 par le peptide PP couplé à la KLH sont présentés dans figure 1. La DO corrigée correspond à la DO de l'animal immunisé moins la DO du pools des animaux témoins.

On constate une grande homogénéité de la réponse anticorps anti-PP chez les souris. Par ailleurs, cette réponse est très élevée puisque les sérums dilués au 1/8000 et au 1/16000 donnent une DO corrigée entre 0,8 et 1,2 (optimum de lecture).

Des résultats similaires ont été obtenus pour l'essai 2.

Les résultats de la réponse anticorps IgG<sub>2A</sub> anti-PP exprimée en DO corrigée des essais d'immunisation 1 et 2 par le peptide PP couplé à la KLH sont présentés dans la figure 2.

15 On constate une certaine homogénéité de la réponse anticorps IgG<sub>2A</sub> anti-PP chez les souris exceptée la souris 5 dans l'essai 1. Par ailleurs cette réponse est élevée mais moins importante que la réponse IgG<sub>1</sub> anti-PP.

Des résultats similaires ont été obtenus pour l'essai 2, l'homogénéité de la réponse anticorps étant cependant plus faible.

20 Au bilan, l'immunisation de souris par le peptide PP couplé à la KLH induit une réponse anti-PP IgG<sub>1</sub> et IgG<sub>2A</sub> à la fois élevée et homogène.

Le peptide PP couplé à la protéine KLH est donc très immunogène.

### 3-2 Immunogénicité du peptide PP non couplé

25 Pour tester l'immunogénicité du peptide PP seul, une immunisation par le peptide PP sur le modèle lapin a été effectuée avec adjonction à chaque injection de l'adjuvant incomplet de Freund.

Plus précisément, deux injections de 400 µg de peptide PP avec l'adjuvant incomplet de Freund (v/v) ont été réalisées sous un volume total de 2 ml.

30 Les deux injections ont été administrées à deux semaines d'intervalle par voie sous cutanée. Le sérum de lapin a été récupéré deux semaines après la seconde injection. Un titrage des anticorps anti-PP a été effectué sur ce sérum.

Les anticorps anti-PP ont été dosés chez le lapin par la technique ELISA décrite ci-dessus avec une antiglobuline anti-lapin biotinylée (BioAtlantic) au 1/3000 et comme révélateur de la streptavidine couplée à la peroxydase (RPN1231, 35 Amersham pharmacia biotech).

Les résultats de la réponse anticorps IgG anti-PP exprimée en DO corrigée (DO à J28 donc après la seconde immunisation moins la DO à J0) de l'essai d'immunisation par le peptide PP sont présentés dans la figure 3.

La réponse anticorps contre le peptide PP est très élevée puisque à une dilution de 102400, une réponse contre le peptide PP est toujours détectable. Le peptide PP seul est très immunogène.

#### Bilan

- 5 Le peptide PP qu'il soit couplé ou non à une protéine porteuse est capable d'induire une forte réponse sérologique sur différents modèles animaux. Donc le peptide PP est très immunogène.

#### Exemple 4 : Utilisation diagnostique du peptide PP

- 10 Pour tester l'efficacité discriminante du peptide PP comme antigène de diagnostic pour la leptospirose, nous avons étudié des sérums issus d'humains, et d'animaux de différentes espèces vaccinées ou non, atteintes ou non de leptospirose clinique.

Les sérums ont été sélectionnés en fonction des commémoratifs cliniques mais aussi en fonction de leur réponse au test de référence (MAT).

- 15 Les espèces animales testées sont au nombre de 4 et représentent les animaux de compagnie ou de production les plus touchés par la leptospirose :

- le chien
- le bovin
- le cheval
- 20 ▪ le porc

#### Technique ELISA

- Les anticorps anti-PP ont été dosés par la technique ELISA décrite ci-dessus avec les antiglobulines couplées à la peroxydase choisies en fonction de l'espèce dont est issu le sérum analysé (anti-humain, anti-chien, anti-bovin, anti-cheval ou anti-porc  
25 (Jackson).

Les anticorps anti-PPL ont été dosés par la même technique.

#### Résultats

##### 4-1 Humains IgG et IgM (ref fig 4)

L'étude a été réalisée sur quarante sérums humains :

- 30 - 10 de ces sérums sont des cas non atteints de leptospirose mais confirmée lyne positif.

- Trente de ces sérums proviennent de l'institut Pasteur. Les tests MAT et EIA ont été réalisés par le CNR des leptospires de l'Institut Pasteur de Paris. Les résultats, titre en MAT et en EIA (IgM) de cinq de ces sérums représentatifs des trente sont présentés

dans le tableau 1 dont 4 seulement la leptospirose a été sérologiquement confirmée par l'Institut Pasteur.

Dans tous les cas de figure, le témoin négatif correspond à un pool de sérums d'individus en bonne santé ( avant vaccination) et contrôlés individuellement en

5 MAT.

	sérums				
	1	2	21	24	27
Anticorps de classe IgM (EIA)*	3200	négatif	3200	1600	1600
MAT **					
<i>L. interrogans</i> australis	100	100	400	Négatif	400
<i>L. interrogans</i> autumnalis	100	Négatif	50	50	100
<i>L. interrogans</i> bataviae	Négatif	Négatif	Négatif	100	50
<i>L. interrogans</i> canicola	800	Négatif	400	400	800
<i>L. interrogans</i> castellonis	200	Négatif	50	6400	Négatif
<i>L. interrogans</i> cynopteri	800	Négatif	3200	400	400
<i>L. interrogans</i> grippotyphosa	Négatif	Négatif	Négatif	50	50
<i>L. interrogans</i> hardjo	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
<i>L. interrogans</i> hebdomadis	200	Négatif	400	Négatif	400
<i>L. interrogans</i> icterohaemorrhagiae	3200	50	800	1/400	800
<i>L. interrogans</i> panama	Négatif	Négatif	50	Négatif	Négatif
<i>L. interrogans</i> pomona	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	50
<i>L. interrogans</i> pyrogenes	400	Négatif	Négatif	400	Négatif
<i>L. interrogans</i> sejroe	100	Négatif	200	50	800
<i>L. interrogans</i> tarassovi	200	Négatif	100	50	400
Leptospirose	Sérologiquement confirmée	Négatif	Sérologiquement confirmée		

\*limite 400

\*\*limite 100

10

Tableau 1: Titre MAT et EIA de 5 sérums provenant de malades humains suspectés de leptospirose clinique

Analyse de la spécificité des réponses anticorps IgM et IgG contre le peptide PP et contre la protéine recombinante PPL sur des sérums humains non atteints de leptospirose

5 Afin d'estimer les potentielles réponses croisées entre spirochètes, dans un premier temps, des sérologies ont été effectuées sur onze sérums humains dont dix proviennent de cas atteints de la maladie de Lyme ; les réponses anticorps IgM et IgG ont été analysées contre le peptide PP mais aussi contre la protéine recombinante PPL.

10 Les résultats de la réponse IgG et IgM dirigée contre le peptide PP et contre la protéine recombinante PPL de 3 sérums représentatifs sont représentés dans la figure 4 en comparaison du témoin négatif (pool de sérums négatifs en MAT d'individus sains).

Réponse contre la protéine recombinante PPL

15 Compte tenu du témoin et du sérum<sup>2</sup>, le sérum 153 272 du cas confirmé lyme positif présente une réponse sérologique IgM significative contre la protéine recombinante PPL.

Par ailleurs, une réponse sérologique IgG importante contre la protéine recombinante est détectée pour le témoin mais aussi pour les sérums négatifs pour la leptospirose ne permettant pas un usage sérologique discriminant de PPL.

Réponse contre le peptide PP

20 Ces résultats montrent que pour des cas confirmés de maladie de Lyme et indemnes de leptospirose (sérums 151358 et 153272), la réponse IgM et IgG contre le peptide PP est du même ordre que celle du témoin (pool de sérums).

Analyse des réponses anticorps IgM et IgG contre le peptide PP sur des sérums d'humains atteint ou non de leptospirose

25 Dans un second temps, afin d'apprécier la sensibilité, la réponse IgG et IGM dirigée contre le peptide PP a été analysée sur trente sérums humains atteints de leptospirose (provenant de l'institut Pasteur).

30 Les résultats de la réponse IgG et IgM dirigée contre le peptide PP de 5 sérums représentatifs (voir tableau 1) sont représentés dans la figure 5 en comparaison du même témoin négatif.

Chiens IgG et IgM

Chiens SPF vaccinés : Analyse de la spécificité des réponses anticorps IgM et IgG contre le peptide PP et contre la protéine recombinante PPL sur des sérums de chiens SPF vaccinés ou non contre la leptospirose

5 Dans un premier temps, des sérologies ont été effectuées sur des sérums de chiens SPF vaccinés contre la leptospirose ou non. Le test MAT a été réalisé parallèlement dans le laboratoire.

Les résultats de la réponse IgG et IgM dirigée contre le peptide PP et contre la protéine recombinante PPL de ces sérums sont représentés dans la figure 6 en comparaison du témoin négatif (pool de sérums provenant de chiens SPF non vaccinés).

10 Réponse contre la protéine recombinante PPL

Compte tenu du témoin (chiens SPF non vaccinés), la réponse sérologique IgM anti-PPL des chiens vaccinés est significativement plus intense.

Par ailleurs, la réponse sérologique IgG élevée contre la protéine recombinante du témoin négatif ne permet pas d'estimer la réponse vaccinale spécifique.

15 Réponse contre le peptide PP

Les résultats de l'étude de la réponse anticorps IgG et IgM dirigée contre le peptide PP des chiens vaccinés sont présentés dans la figure 6. Les sérums de trois chiens SPF vaccinés par différents vaccins contre la leptospirose (N° de sérum : 3039, 3051, 3058) développent une réponse IgM du même ordre que celle du témoin négatif (pool de sérums). La réponse IgG anti-PP quant à elle est plus forte que celle du témoin mais reste faible puisque inférieure à une DO de 0,25.

25 Chiens tout venants suspectés de leptospirose clinique par comparaison aux chiens SPF : analyse des réponses anticorps IgM et IgG contre le peptide PP sur des sérums de chiens tout venants atteints ou non de leptospirose (qu'ils soient vaccinés ou non)

L'étude a été réalisée sur plus de quarante sérums canins. Les réponses anticorps IgM et IgG dirigées contre l'antigène PP sont présentées pour 10 chiens représentatifs des différents cas que l'on peut observer.

30 Le test MAT a été réalisé parallèlement dans le laboratoire. Les résultats de ces réponses anticorps anti-PP sur ces 10 sérums canins sont présentés dans la figure 7 en comparaison d'un témoin négatif.

Les chiens suspects de leptospirose clinique non vaccinés



Les résultats de l'étude de la réponse anticorps IgG et IgM dirigée contre le peptide PP des chiens non vaccinés sont présentés dans la figure 7A. Le témoin négatif correspond au sérum de chiens SPF et ne présente pas de réponse anticorps IgM et IgG significatives. Les sérums 210749 et 210750 ont été prélevés sur le même chien à 4  
 5 jours de différence. Le titre MAT du premier prélèvement est négatif alors que la réponse anticorps IgM anti-PP est très élevée ( $DO > 0,6$ ) et la réponse IgG anti-PP débute puisqu'on atteint une DO de 0,3 en fin d'évolution clinique. On constate une séroconversion par le MAT (titre = 160) et parallèlement, la réponse IgM anti-PP a diminué pour laisser place à une réponse IgG anti-PP très élevée ( $DO > 0,9$ ).

10 Le peptide PP peut donc s'avérer très utile pour les diagnostics de leptospirose et plus particulièrement en phase précoce car une réponse anticorps IgM anti-PP peut être détectée alors que le titre MAT est encore négatif.

Le sérum 210845 correspond à un chien atteint de leptospirose confirmée. On peut observer une réponse anticorps IgM et IgG anti-PP élevées et de même  
 15 intensité.

#### Les chiens vaccinés

Les résultats de l'étude de la réponse anticorps IgG et IgM dirigée contre le peptide PP des chiens vaccinés sont présentés dans la figure 7B avec la référence des témoins SPF vaccinés (N° de sérum : 3039, 3051, 3058)

20 Le sérum 211466 correspond à un chien présentant des signes cliniques de leptospirose, cependant le titre MAT de ce sérum est non significatif. La réponse anticorps IgM anti-PP est très élevée ( $DO > 0,7$ ) alors que la réponse IgG anti-PP est non significative. Le chien est donc bien probablement atteint de leptospirose en phase très précoce. La réponse importante en IgM anti-PP est en faveur d'un début de réponse  
 25 sérologique (attesté par le titre modéré en MAT).

Les sérums 21463 et 21457 correspondent à des chiens présentant des signes cliniques de leptospirose confirmée en MAT de durée d'évolution plus longue que le cas précédent. Ils présentent une forte réponse en IgM et IgG dirigée contre le peptide PP.

30 Bilan :

Le peptide PP se révèle un antigène discriminant de l'infection leptospirosique que les chiens soient vaccinés ou non. L'utilisation de l'antigène PP permet de détecter des cas de leptospiroses en phase précoce, l'état vaccinal antérieur n'empêchant

pas l'interprétation diagnostique contrairement au MAT pour lequel l'interprétation de titres faibles est sujette à caution.

#### Bovins IgG

L'étude a été réalisée sur trente sérums bovins.

5 Les résultats des réponses anticorps anti-PP sur 4 sérums bovins représentatifs des trente analysés sont présentés dans la figure 8 en comparaison d'un témoin négatif.

Si tous les animaux des cheptels bovins (et autres ruminants et porcs) sont exposés à l'infection leptospirosique, peu d'animaux expriment cliniquement la maladie. Néanmoins, la cohorte est soumise au risque infectieux et tous les animaux  
10 développent une réponse immunitaire, parfois difficile à détecter en MAT, d'où la nécessité de diagnostic de groupe.

Les résultats présentés proviennent donc d'animaux n'ayant pas nécessairement avorté eux-mêmes mais provenant de cheptels dans lesquels des avortements liés à la leptospirose ont été suspectés car non reliés à des étiologies classiques  
15 et par ailleurs fortement suspectés de leptospirose sur les résultats globaux du groupe en MAT.

La réponse IgG vis à vis de PP a été étudiée sur 30 sérums de bovins provenant de 7 cheptels différents, par comparaison d'un sérum témoin provenant d'un pool de sérums de cheptels composés d'animaux tous négatifs en MAT. Les résultats de  
20 quatre sérums représentatifs sont présentés dans la figure 8. Les sérums 1398, 1399 et 1401 sont des sérums positifs en MAT. Le sérum 4126 provient d'un cheptel comportant des animaux positifs en MAT, mais est lui-même négatif à ce test alors que la réponse est très forte vis à vis de PP.

Bilan : ces résultats confirment l'intérêt du peptide en tant qu'antigène capable  
25 de mettre en évidence une réponse immunitaire à une infection par les leptospires.

#### Cheval IgG

Les résultats des réponses anticorps anti-PP sur 6 sérums équins sont présentés dans la figure 9 en comparaison d'un témoin négatif.

Pour cette espèce, le choix s'est porté sur une catégorie particulière d'animaux : les animaux atteints d'uvéite. Certaines uvéites du cheval sont liées soit à une phase primaire d'invasion par les leptospires (auquel cas l'animal est généralement positif en MAT) soit une phase clinique tardive ou récidivante provoquée par un phénomène dit d'autoimmunisation. Ce phénomène s'expliquerait par la sensibilisation à une protéine de leptospire proche d'une protéine de leptospire. Cette protéine aurait une MM de 55-60 kDa et est donc différente de celle de PPL, protéine porteuse de la séquence PP décrite ici.

La figure 9 présente des résultats caractéristiques de 6 animaux atteints d'uvéite :

Les sérums 421 et 1992 correspondent à une cinétique sérologique du même animal. Lors du premier prélèvement l'animal était négatif en MAT et est devenu positif lors du deuxième prélèvement, attestant que cette uvéite pouvait être interprétée comme un signe d'infection évolutive en cours par les leptospires.

Les animaux 2077 et 6771 sont légèrement positifs en MAT mais aussi vis à vis de PP, confortent l'origine leptospirosique de l'uvéite observée.

En revanche Les animaux 3848 et 4507 développent une uvéite (probablement une récurrence) dont l'origine leptospirosique ne peut être confirmée par le MAT. En revanche ces animaux ont développé une forte réponse vis à vis de PP confortant l'origine leptospirosique de l'uvéite.

Bilan : ces résultats confirment l'intérêt du peptide en tant qu'antigène capable de mettre en évidence une réponse immunitaire à une infection par les leptospires.

Bilan global de l'utilisation diagnostique de PP:Quelle que soit l'espèce considérée, le peptide PP se révèle être un antigène capable de mettre en évidence une réponse immunitaire à une infection par les leptospires, et en particulier en phase précoce car une réponse anticorps IgM anti-PP peut être détectée alors que le titre MAT est encore négatif ou est sujet à caution dans le cas d'animaux vaccinés.

Exemple 5 : Réponse anticorps contre le peptide PP des gerbilles immunisées par PPL via l'adénovirus

Un protocole de vaccination/épreuve a permis de mettre en évidence la protection induite par une suspension du virus recombinant Ad-ppl qui exprime la protéine recombinante PPL (Demande Internationale WO96/36355, Branger C, Sonrier C, Chatrenet B, Klonjowski B, Ruvoen-Clouet N, Aubert A, Andre-Fontaine G, Eloit M. « Identification of the hemolysis-associated protein 1 as a cross-protective

immunogen of *Leptospira interrogans* by adenovirus-mediated vaccination ». Infect Immun. 2001 Nov; 69(11):6831-8.).

Les anticorps anti-PP ont été dosés chez la gerbille par la technique ELISA décrite ci-dessus avec une antiglobuline anti-gerbille biotinylée (BioAtlantic) au 1/3000 et comme révélateur de la streptavidine couplée à la peroxydase (RPN1231, Amersham pharmacia biotech).

Pour chaque lot de gerbilles, les sérums ont été regroupés aux différentes dates de prélèvements J0 (avant la première immunisation), J21 (avant la seconde immunisation), J35 (avant l'épreuve virulente) et J70 (35 jours après l'épreuve virulente).

Les résultats de la réponse anticorps IgG contre le peptide PP exprimée en DO corrigée à sont présentés dans la figure 10.

L'immunisation par la protéine PPL via l'adénovirus induit une réponse anticorps contre le peptide PP significative.

La réponse anticorps anti-PP, suite à la première injection apparaît rapidement pour le groupe immunisé par l'adénovirus exprimant la protéine recombinante PPL. La réponse anticorps reste stable entre le 21<sup>ème</sup> jour et le 35<sup>ème</sup> jour : la seconde immunisation n'a pas induit d'effet rappel, le maximum de la réponse vaccinale semble atteint dès le 21<sup>ème</sup> jour.

L'épreuve canicola effectuée le 35<sup>ème</sup> jour permet l'apparition d'une réponse contre le peptide PP dans le groupe témoin et provoque une réponse anamnestic dans le groupe immunisé par la protéine PPL via l'adénovirus.

On observe donc une réponse anticorps dirigée contre le peptide PP suite à l'immunisation par PPL via l'adénovirus et cette réponse anticorps peut avoir un rôle dans la protection observée sur ce groupe vacciné soumis à une EV canicola.

#### Bilan

La vaccination a induit une réponse anti-PP maximale pour la stimulation induite par la dose d'adénovirus exprimant PPL employée. La relance anamnestic provoquée par l'épreuve virulente suit une pente plus faible que la réponse développée par les témoins. La protéine PPL porteuse des épitopes PP étant sécrétée par les leptospires pathogènes, la stimulation antigénique induite par l'épreuve virulente est plus faible chez les animaux protégés par la vaccination que chez les témoins, chez lesquels la souche virulente ne rencontre pas d'obstacle à sa multiplication.

Exemple 6 : Essai de vaccination par la protéine recombinante PPL (comparatif) :

L'immunisation avec la protéine recombinante PPL a été effectuée sur le modèle gerbille afin de tester la protection susceptible d'être apportée par cette

protéine. Les adjuvants permettent d'augmenter l'immunogénicité des antigènes en créant généralement une réaction inflammatoire qui ralentit l'élimination de l'antigène et favorise sa capture et sa présentation aux lymphocytes. La nature de l'adjuvant va orienter la production de cytokines favorisant le développement d'une réponse à médiation cellulaire ou humorale.

Trois adjuvants ont été testés : d'une part l'adjuvant de Freund dans l'expérience 1 et d'autre part le QS 21 (saponine) avec l'hydroxyde d'aluminium dans l'expérience 2.

#### Essai 1 : Adjuvant de Freund

L'immunisation par la protéine recombinante PPL a été effectuée sur le modèle gerbille et suivie d'une épreuve virulente canicola à 100 UT diluée à  $10^{-1}$  (lot 1 et 2) et à  $10^{-2}$  (lot 3 et 4)

Les résultats de cette expérience (taux de survie) sont présentés dans le tableau 2.

	Epreuve virulente $10^{-1}$		Epreuve virulente $10^{-2}$	
	Lot 1 (PPL)	Lot 2 témoin	Lot 3 (PPL)	Lot 4 témoin
	Morts/vivants	Morts/vivants	Morts/vivants	Morts/vivants
9/07/99	1/10	0/15	0/10	0/15
EV : Can, j0	0/9	0/15	0/10	0/15
J11	4/5	8/7	0/10	0/15
J12	4/1	4/3	1/9	1/8
J13	1/0	1/2	3/6	7/7
J14	0/0	0/2	2/4	1/6
J15	0/0	0/2	1/3	4/2
J16	0/0	0/2	0/3	0/2
J30	0/0	0/2	0/3	0/2
Vivants/effectif*	0/10	2/15	3/10	2/15

Tableau 2 : Tableau de survie de gerbilles immunisées par la protéine recombinante PPL avec l'adjuvant de Freund après épreuve virulente canicola

**Caractères en GRAS** : début de la mortalité des gerbilles pour chaque lot

\* effectif considéré à partir de l'épreuve virulente J0

Le taux de mortalité du lot immunisé par la protéine recombinante PPL en présence d'adjuvant de Freund quelle que soit l'épreuve virulente considérée avec celui des lots témoins correspondant, sont similaires.

La mortalité des lots soumis à la même épreuve virulente débute en même temps : le 11<sup>ème</sup> et le 12<sup>ème</sup> jour pour respectivement les épreuves virulentes à 100 UT diluée à  $10^{-1}$  et  $10^{-2}$ .

- 5 Cet essai n'a pas permis de mettre en évidence une protection significative induite par l'immunisation par la protéine recombinante PPL après une épreuve virulente canicola.

Essai 2 : Adjuvant hydroxyde d'alumine et QS 21

- 10 L'essai d'immunisation par la protéine recombinante PPL a été reconduite dans les mêmes conditions cependant la protéine a été adjuvée avec le QS 21 et l'hydroxyde d'alumine.

L'immunisation de gerbilles par la protéine recombinante PPL adjuvée par le QS 21 et l'hydroxyde d'alumine a été suivie d'une épreuve virulente canicola. Les résultats sont présentés dans le tableau 3.

	Lot immunisé par PPL	Lot témoin
	Morts/vivants	Morts/vivants
6/04/2000	1/15	0/15
EV : Can, J0 19/04/2000	0/14	0/15
J8	1/13	2/13
J9	4/9	2/11
J10	0/9	2/9
J11	2/7	0/9
J12	0/7	0/9
J13	0/7	0/9
J30	0/7	0/9
Vivant/effectif*	7/14	9/15

- 15 Tableau 3 : Tableau de survie de gerbilles immunisées par la protéine recombinante PPL adjuvée par l'hydroxyde d'alumine et le QS 21 après épreuve virulente canicola

Caractères en GRAS : début de la mortalité des gerbilles pour chaque lot

- 20 \* effectif considéré à partir de l'épreuve virulente J0

Le taux de survie pour le lot immunisé par la protéine recombinante PPL adjuvée et le lot témoin sont similaires. La mortalité des gerbilles des deux lots débute le même jour : le 8<sup>ème</sup> jour.

Il ne nous a pas été possible de mettre en évidence une protection significative apportée par la protéine recombinante PPL que ce soit en présence d'adjuvant de Freund ou l'hydroxyde d'alumine couplée à le QS 21.

Donc, quel que soit l'adjuvant utilisé, aucune protection significative suite à l'immunisation par la protéine recombinante PPL n'a pu être mise en évidence. Or, un protocole de vaccination/épreuve a permis de mettre en évidence la protection induite par une suspension du virus recombinant Ad-*pp1* qui exprime la protéine recombinante PPL (Brevet WO96/36355, Branger et al, 2001). Il paraît donc essentiel de déterminer le ou les épitopes de la protéine PPL responsables de l'effet protecteur observé.

Dans cet objectif, l'effet protecteur du peptide PP a été comparé avec celui obtenu avec PPL.

Exemple 7 : Essai de vaccination par le peptide PP couplé ou non à la protéine porteuse KLH

Le but de l'immunisation par le peptide PP sur le modèle gerbille est à la fois d'évaluer l'antigénicité de la séquence choisie par la réponse anticorps et l'éventuelle protection apportée par ce peptide.

Essai 1 : Protocole de vaccination des gerbilles par le peptide PP couplé à la protéine porteuse KLH

Un protocole de vaccination /épreuve a été mis en œuvre pour évaluer la protection que peut apporter le peptide PP (seq ID N°1) couplé à la protéine KLH.

Cette construction est administrée par voie sous cutanée sans adjuvant avec comme contrôle négatif du PBS (lot 2).

Lot1 : 10 gerbilles, 2 injections de 30 µg de PP-KLH sous 300 µl en sous cutanée

Lot 2 : 10 gerbilles, 2 injections de PBS sous 300 µl

Les deux injections sous un volume de 300 µl ont été administrées à deux semaines d'intervalle par voie sous cutanée. Une épreuve virulente par injection par voie intra-péritonéale de 0,5 ml d'une culture canicola titrant 90 à 100 UT (turbidimétrie) diluée à  $10^{-2.5}$  a été réalisée deux semaines après la seconde injection.

- Réponse antigénique : Suivi par ELISA de la réponse immunitaire des gerbilles contre le peptide PP

Les anticorps anti-PP ont été dosés chez la gerbille par une technique ELISA (décrite ci-dessus) avec une antiglobuline anti-gerbille biotinylée (BioAtlantic) au

1/3000 et comme révélateur de la streptavidine couplée à la peroxydase (RPN1231, Amersham pharmacia biotech).

Pour chaque lot de gerbilles, les sérums ont été regroupés aux différentes dates de prélèvements j0 (avant la première immunisation), J14 (avant la  
5 seconde immunisation), J28 (avant l'épreuve virulente).

Les résultats de la réponse anticorps IgG contre le peptide PP exprimée en DO corrigée (DO des sérums traités corrigée par la DO du sérum témoin) sont présentés dans la figure 11.

L'immunisation par le peptide PP couplé à la KLH induit une réponse  
10 anticorps significative contre le peptide PP. La réponse anticorps anti-PP, suite à la première injection est très élevée puisque les sérums dilués au 1/6400 et au 1/12800 (figure 11, A) donnent une DO corrigée entre 0,8 et 1,2 (optimum de lecture). Un net effet rappel est provoqué par la seconde injection puisque la DO corrigée obtenue à j28 est supérieure au double de celle obtenue à j14 pour les trois dilutions observées (figure 11, B).

15 Conclusion :

L'antigénicité du peptide choisi est importante.

Protection contre EV

Les résultats de cet essai en terme de taux de mortalité et courbe de survie sont présentés respectivement dans le tableau 4 et la figure 12.

Date	Lot 1 PP-KLH	Lot 2 PBS
Av EV	10	10
EV *	10	10
J4	10	10
J5	10	10
J6	7	5
J7	5	3
J8	4	0
j9	4	0
j10	4	0
j11	4	0
J30	4	0
Taux de mortalité	6/10	10/10
Taux de survie	4/10	0/10



Tableau 4 : Tableau de mortalité de gerbilles immunisées par le peptide PP couplé à la protéine carrier KLH après épreuve virulente canicola<sup>10-2,5</sup>.

La mortalité du lot 2 correspondant au groupe témoin ayant reçu du PBS (0/10) est très forte puisque à j8 aucune gerbille n'est survivante à une épreuve virulente *L. interrogans* sérovar canicola. Cette épreuve virulente est sévère car d'une part la DL100 a été atteinte en 8 jours et d'autre part la mortalité a débuté précocement, dès le 5<sup>ième</sup> jour, et a été très rapide puisque tous les témoins sont morts en 3 jours. En revanche, on constate que 4 des 10 animaux du lot de gerbilles vaccinées par le peptide PP couplé à la protéine KLH survivent de façon définitive (surveillance de quatre semaines après épreuve virulente).

Cette expérience ne permet pas de démontrer au risque usuel de 0,05 une protection significative induite par le peptide PP contre un challenge Canicola 10<sup>-2,5</sup>. Cependant, cette protection existe pour un risque  $p < 0,07$  (test de Logrank).

Essai 2 : Protocole de vaccination des gerbilles par le peptide PP couplé ou non à la protéine porteuse KLH

L'expérience de vaccination par le peptide PP couplé à la protéine porteuse KLH a été reconduite dans les conditions similaires pour valider les résultats obtenus dans l'essai 1. Cependant, il nous a semblé intéressant de reproduire également cet essai avec le peptide non couplé compte tenu de la forte antigénicité du peptide PP mise en évidence dans l'essai 1.

Un essai de vaccination /épreuve a été mis en œuvre pour évaluer la protection que peut apporter le peptide PP (seq ID N°1) couplé ou non à la protéine KLH.

Cette construction est administrée par voie sous cutanée sans adjuvant, le PBS comme contrôle négatif est administré par la même voie (lot 3).

Lot 1 : 12 gerbilles, 2 injections de 30 µg de PP-KLH sous 300 µl

Lot 2 : 12 gerbilles, 2 injections de 30 µg de PP sous 300 µl

Lot 3 : 15 gerbilles, 2 injections de PBS sous 300 µl

Les deux injections sous un volume de 300 µl ont été administrées à deux semaines d'intervalle par voie sous cutanée. Une épreuve virulente par injection par voie intra-péritonéale de 0,5 ml d'une culture de leptospires sérovar canicola titrant 90 à 100 UT (turbidimétric) diluée à 10<sup>-2</sup> a été réalisée trois semaines après la seconde injection.

Les résultats de cet essai en terme de taux de mortalité et courbe de survie sont présentés respectivement dans le tableau 5 et la figure 13 :

	Lot 1 PP-KLH	Lot 2 PP	Lot 3 Te (PBS)
EV : Can, jo	12	12	15
J4	0/12	0/12	0/15
J5	0/12	0/12	0/15
J6	0/12	0/12	1/15
J7	0/12	0/12	4/14
j8	0/12	2/12	1/10
j9	1/12	2/10	1/9
j10	0/11	0/8	0/8
j11	0/11	0/8	0/8
j12	0/11	0/8	0/7
j13	0/11	0/8	0/7
j14	0/11	0/8	0/7
j15	0/11	0/8	0/7
j16	0/11	0/8	0/7
j17	0/11	0/8	0/7
j28	0/11	0/8	0/7
Taux de mortalité	8.3	33.3	53.3
Taux de survie	91.6	66.7	46.7

Tableau 5 : Tableau de mortalité de gerbilles immunisées par le peptide PP couplé ou non à la protéine porteuse KLH après épreuve virulente canicola $10^{-2}$ .

- 5 La mortalité du lot 3, groupe témoin ayant reçu du PBS, est la plus forte de tous les lots et correspond à la dose létale 50 (7/15). La mortalité chez les témoins a débuté précocement dès J6 alors qu'elle ne commence qu'à J8 pour le lot immunisé par PP et J9 pour le lot immunisé par PP-KLH.

- 10 La mortalité dans le groupe immunisé par PP-KLH suite à une épreuve virulente *L. interrogans* sérovar canicola est la plus faible (1/12) et la plus tardive (J9), alors que celle du lot immunisé par PP est de 4/12 et débute à J8.

Bien que la protection observée par le peptide couplé à la protéine porteuse KLH soit plus efficace, cette expérience permet de mettre en évidence un effet protecteur induit par le peptide PP, couplé ou non à la protéine porteuse KLH, contre une épreuve virulente de leptospires sérovar canicola  $10^{-2}$  à une probabilité  $p < 0,02$  (test de Logrank)

5 Le taux de survie observé pour le lot immunisé par PP-KLH par voie sous cutanée confirme les résultats observés lors de la première expérimentation (Essai 1). Par ailleurs, le bilan de l'essai 1 suite à l'immunisation par le peptide PP confirme la forte immunogénicité de ce peptide et met en évidence son effet protecteur.

#### Analyse statistique des résultats des deux expériences

	Expérience 1		Expérience 2		cumul des deux essais	
	$\chi^2$	$p$	$\chi^2$	$p$	$\chi^2$	$p$
PP-KLH/control		$<7.10^{-2}$	6,84	$<1.10^{-2}$	10,1	$<2.10^{-3}$
PP/control	—	—	5,64	$<2.10^{-2}$	—	—

10 Tableau 6 : analyse statistique des essais vaccinations par le peptide PP couplé ou non selon le test de Logrank

Le peptide PP couplé à la protéine porteuse KLH apporte une protection significative contre un challenge canicola pour les deux expériences. Cette protection est significative sur la survie des animaux estimée par le test de logrank quelle que soit l'expérience ; la combinaison des deux expériences augmente la significativité de l'expérience que ce soit avec le test du  $\chi^2$  ou le test de Logrank.

#### Bilan

La vaccination avec le peptide PP couplé ou non à la protéine KLH a permis de montrer l'effet protecteur du peptide PP, à deux reprises, à la suite d'une épreuve virulente (canicola).

20

## REVENDECATIONS

1. Composé caractérisé en ce qu'il est choisi parmi :

- 5                   - le peptide représenté par la séquence SEQ ID N°1 ci-dessous :  
                   SEQ ID NO : 1    Lys-Ala-Lys-Pro-Val-Gln-Lys-Leu-Asp-Asp-Asp-  
 Asp-Asp-Gly-Asp-Asp-Thr-Tyr-Lys-Glu-Glu-Arg-His-Asn-Lys

ainsi que :

- 10               - les homologues de ce peptide présentant au moins 60% de similarité  
 avec la séquence SEQ ID NO : 1,

- les dérivés de ce peptide sélectionnés parmi :

- les sels pharmaceutiquement acceptables de ce peptide,  
                   - les fragments fonctionnels de ce peptide,  
 15               - les analogues chimiques de ce peptide choisis parmi ceux  
 dans lesquels : un ou plusieurs acides aminés de la séquence peptidique ont été  
 remplacés par leur énantiomère D ; une ou plusieurs liaisons amides peptidiques (-CO-  
 NH-) ont été remplacées par une liaison isostère telle que : -CH<sub>2</sub>NH-, CH<sub>2</sub>S-,  
 CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH=CH- (cis et trans), -COCH<sub>2</sub>-, -CH(OH)CH<sub>2</sub>- et -CH<sub>2</sub>SO- ; un ou  
 20   plusieurs acides aminés ont été remplacés par un acide aminé non naturel,

- les dérivés chimiques de ce peptide choisis parmi : les  
 composés des-alpha amino peptides ; les dérivés N-alpha acyl substitués de la forme  
 RCO-, dans laquelle R représente un groupement alkyle, alcényle, alcynyle, aryle ou  
 aralkyle, linéaire, ramifié, ou cyclique comprenant de 1 à 50 atomes de carbone ; les  
 25   dérivés substitués sur la fonction acide C-terminale par un groupement choisi parmi -  
 NH<sub>2</sub>, les alkyloxy, alkylthio ou alkylamino de la forme -OR, -SR or -NHR, dans  
 lesquels R représente une chaîne alkyle, alcényle, alcynyle, aryle ou un groupement  
 aralkyle, linéaire, ramifié ou cyclique comprenant de 1 à 50 atomes de carbone, les  
 dérivés porteurs d'un substituant pharmacophore, les polymères de ce peptide.

- 30               2. Peptide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il présente au  
 moins 70% de similarité avec la séquence SEQ ID NO : 1, encore plus  
 préférentiellement 80%, de manière préférée au moins 90%, et encore plus  
 favorablement au moins 95%, ou mieux, 98% de similarité avec la séquence SEQ ID  
 NO : 1.

3. Peptide selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il comporte de 15 à 40 acides aminés, préférentiellement de 20 à 30 acides aminés.

4. Peptide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est un fragment fonctionnel du peptide SEQ ID NO : 1 capable d'induire une réponse  
5 immunitaire

5. Peptide comportant au plus 100 acides aminés, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence choisie parmi : SEQ ID NO : 1, un fragment fonctionnel de SEQ ID NO : 1, un homologue de SEQ ID NO : 1, un analogue chimique de SEQ ID NO : 1 ou un dérivé chimique de SEQ ID NO : 1.

10 6. Anticorps caractérisé en ce qu'il reconnaît un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5.

7. Anticorps selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il est dirigé contre le peptide de séquence SEQ ID NO : 1.

8. Anticorps selon la revendication 6 ou la revendication 7, caractérisé  
15 en ce qu'il est un anticorps polyclonal.

9. Anticorps selon la revendication 6 ou la revendication 7, caractérisé en ce qu'il est un anticorps monoclonal.

10. Fragment ou dérivé d'un anticorps selon l'une quelconque des revendications 6 à 9, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les fragments Fab, F(ab')<sub>2</sub>,  
20 ScFv.

11. Acide nucléique caractérisé en ce qu'il code un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5.

12. Vecteur, caractérisé en ce qu'il comporte un acide nucléique selon la revendication 11.

13. Cellule recombinante comprenant un acide nucléique ou un vecteur selon l'une quelconque des revendications 11 et 12.

14. Organisme transgénique non humain comprenant un acide nucléique selon la revendication 11 dans ses cellules.

15. Sonde ou amorce nucléotidique caractérisée en ce qu'elle  
30 comprend un acide nucléique selon la revendication 11.

16. Utilisation d'une sonde ou d'une amorce selon la revendication 15 pour la détection *in vitro* de la présence de souches pathogènes de leptospires dans un échantillon biologique ou une eau contaminée.

17. Utilisation d'un anticorps selon l'une quelconque des  
35 revendications 6 à 10 pour la détection *in vitro* de la présence de souches pathogènes de leptospires dans un échantillon biologique ou une eau contaminée.

18. Utilisation d'un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 pour la détection *in vitro* de la présence d'anticorps anti-leptospire dans un échantillon biologique.

5 19. Kit pour la détection *in vitro* de la présence de souches pathogènes de leptospires dans un échantillon biologique ou une eau contaminée caractérisée en ce qu'il comporte une sonde ou un oligonucléotide ou un couple d'amorces selon l'une quelconque des revendications 11 et 15.

10 20. Composition pharmaceutique comprenant un peptide ou un anticorps ou un acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 1 à 13 et un support pharmaceutiquement acceptable.

21. Composition selon la revendication 20, caractérisée en ce qu'il s'agit d'un vaccin.

22. Composition selon la revendication 20, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une préparation d'anticorps anti-PP à usage thérapeutique

15 23. Utilisation d'un acide nucléique ou d'un vecteur selon l'une quelconque des revendications 11 et 12 pour la production *in vitro* d'un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5.

20 24. Utilisation d'un acide nucléique ou d'un vecteur selon l'une quelconque des revendications 11 et 12 pour la production *in vivo* d'un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5.

18. Utilisation d'un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 pour la détection *in vitro* de la présence d'anticorps anti-leptospire dans un échantillon biologique.

5 19. Kit pour la détection *in vitro* de la présence de souches pathogènes de leptospires dans un échantillon biologique ou une eau contaminée caractérisée en ce qu'il comporte une sonde ou un oligonucléotide ou un couple d'amorces selon la revendication 15.

10 20. Composition pharmaceutique comprenant un peptide ou un anticorps ou un acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 1 à 11 et un support pharmaceutiquement acceptable.

21. Composition selon la revendication 20, caractérisée en ce qu'il s'agit d'un vaccin.

22. Composition selon la revendication 20, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une préparation d'anticorps anti-PP à usage thérapeutique

15 23. Utilisation d'un acide nucléique ou d'un vecteur selon l'une quelconque des revendications 11 et 12 pour la production *in vitro* d'un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5.

20 24. Utilisation d'un acide nucléique ou d'un vecteur selon l'une quelconque des revendications 11 et 12 pour la production *ex vivo* d'un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5.

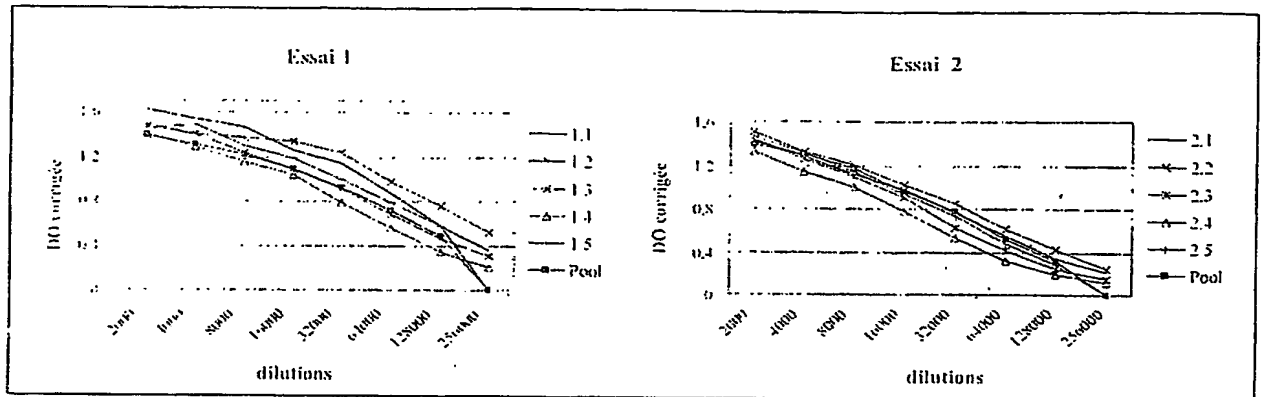


Figure 1

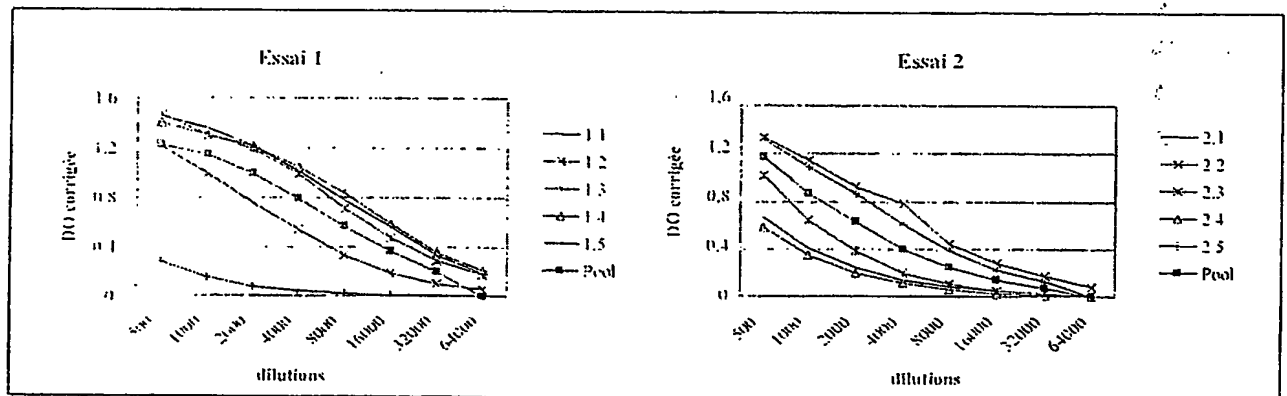


Figure 2



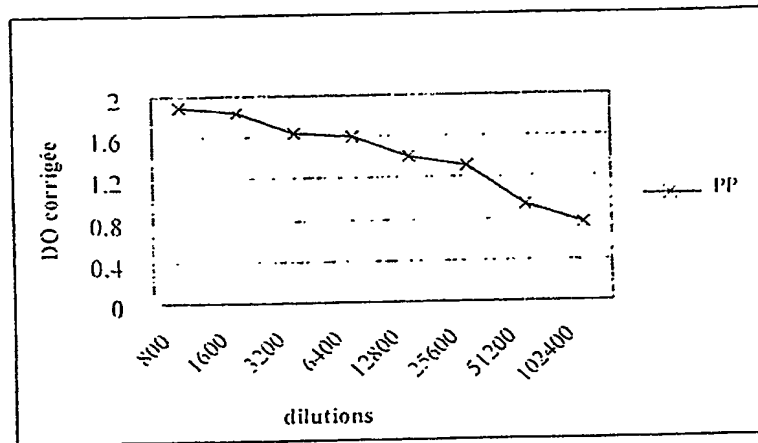


Figure 3

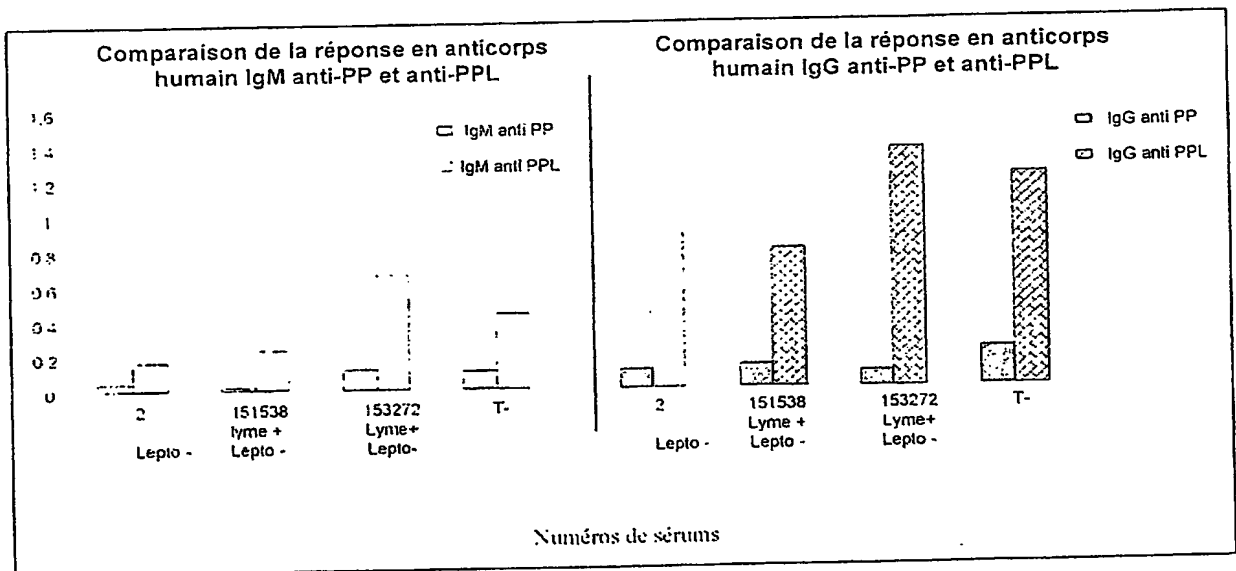
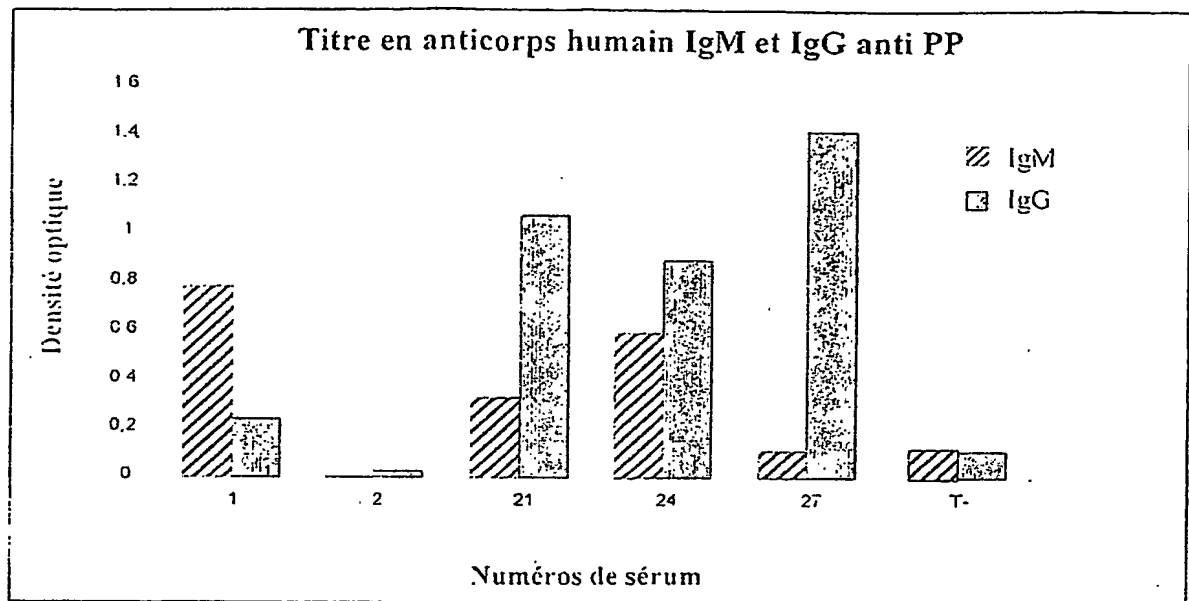
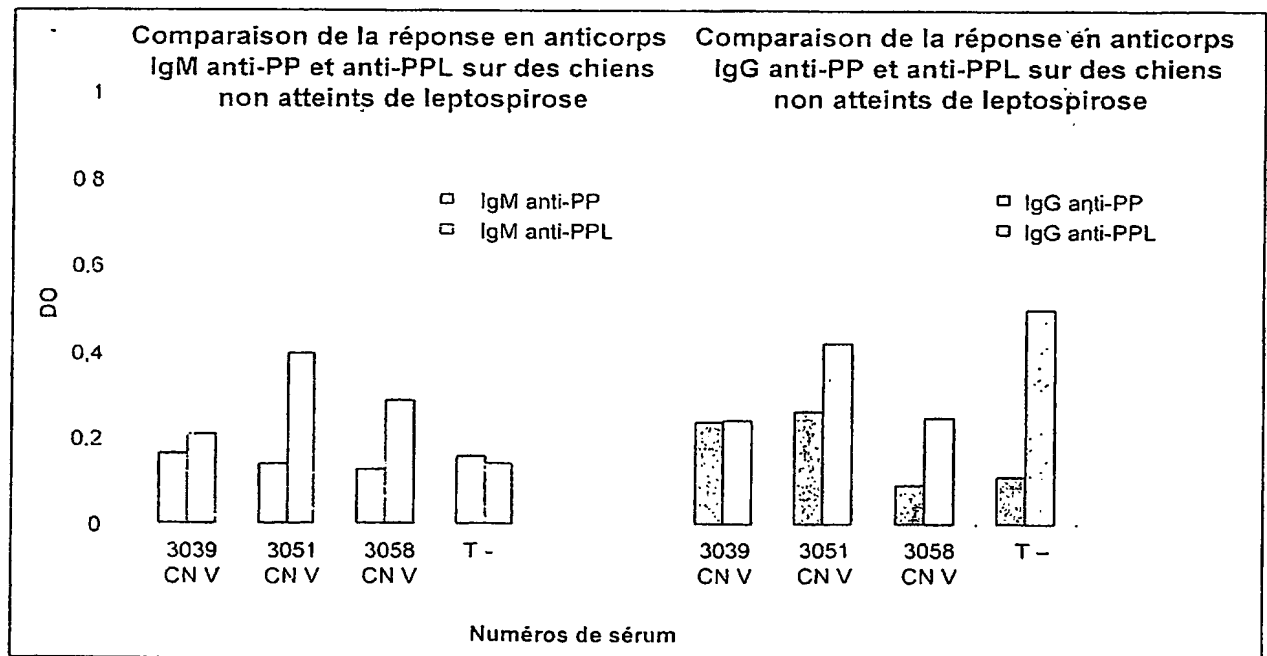


Figure 4

**Figure 5****Figure 6**

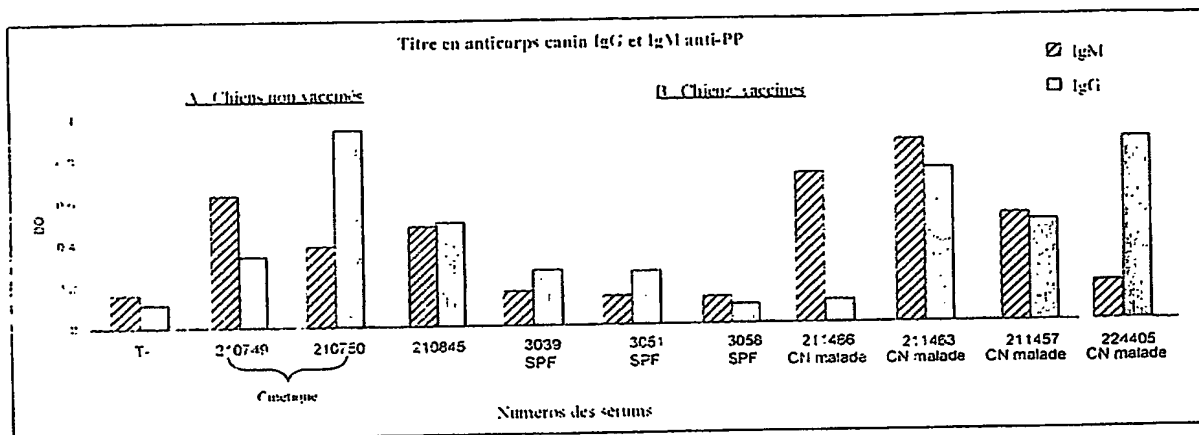


Figure 7

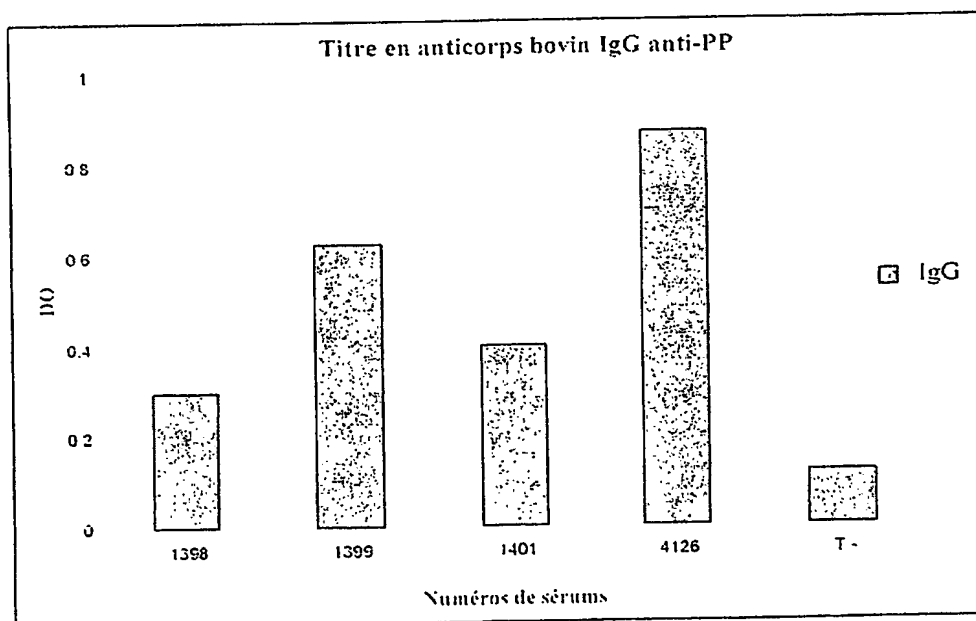
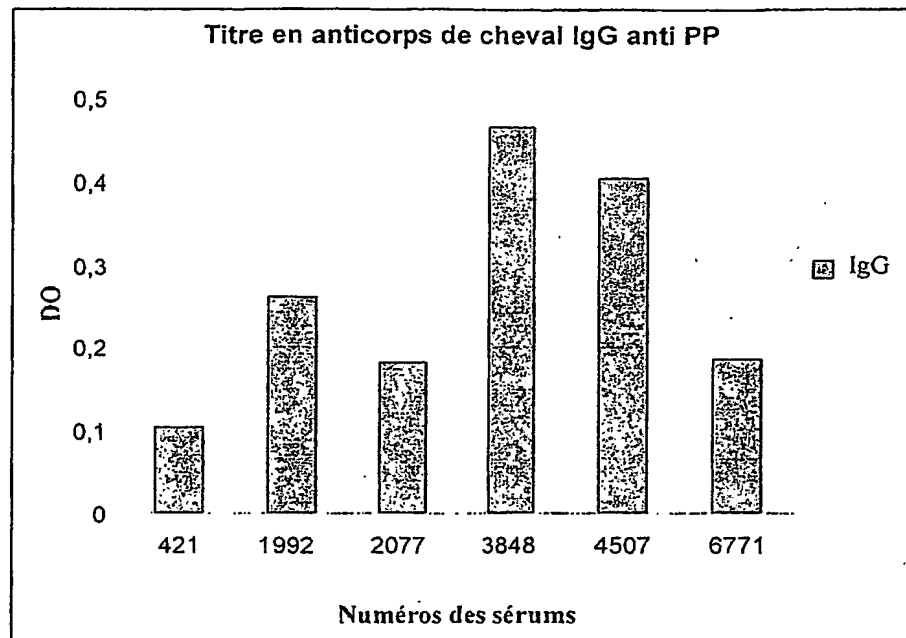
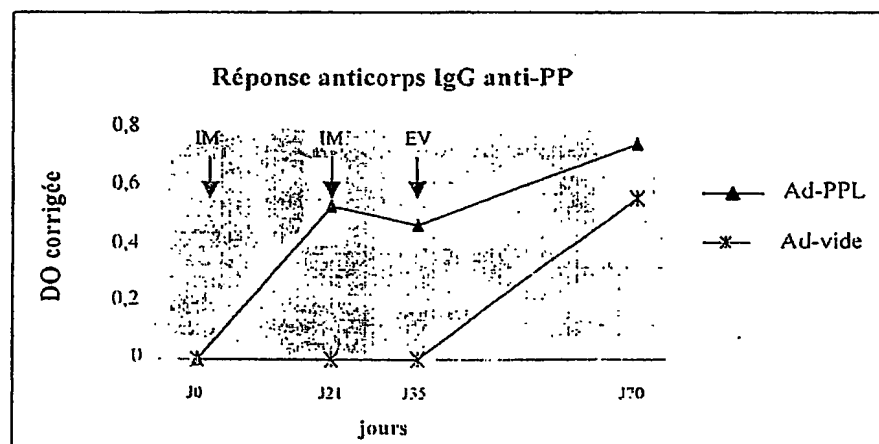


Figure 8



**Figure 9**



**Figure 10**

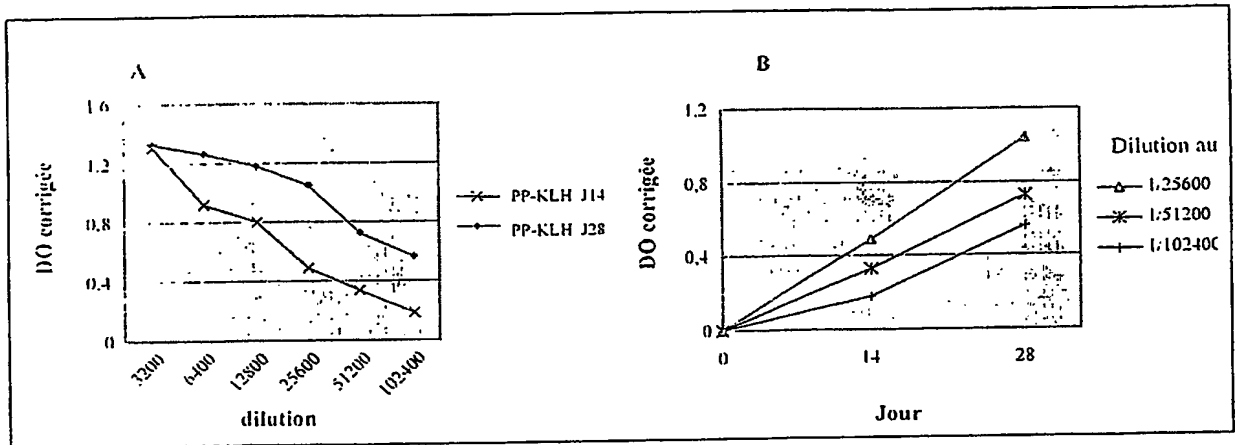


Figure 11

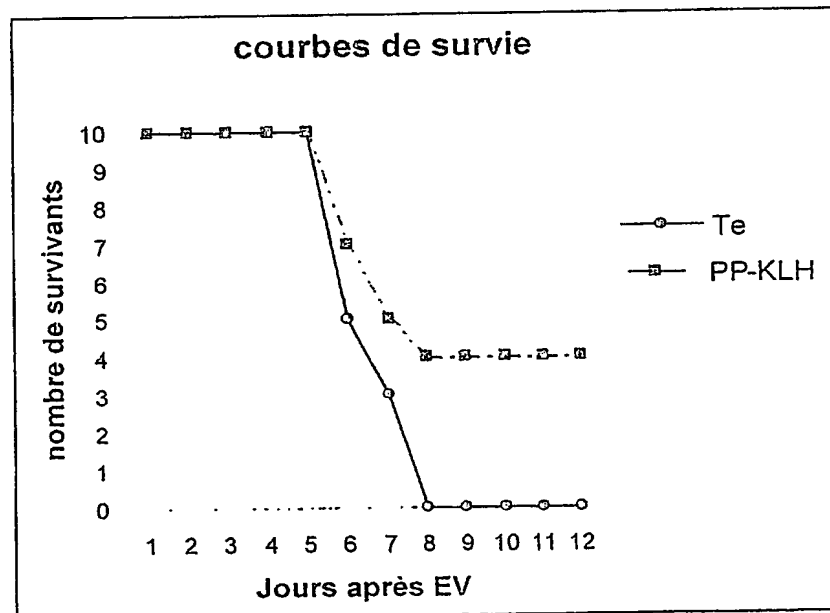
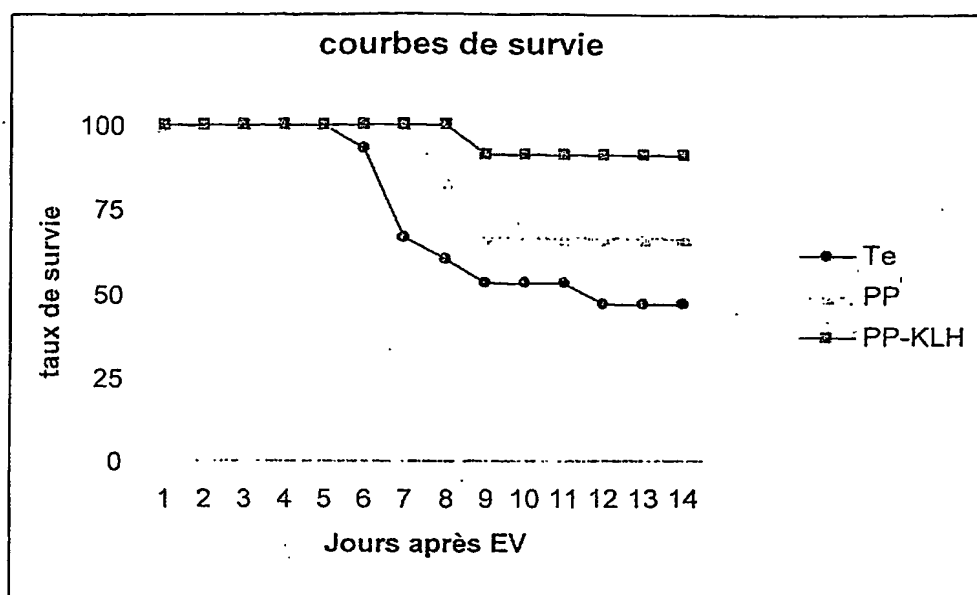


Figure 12



**Figure 13**

# SEQUENCE LISTING

<110> VIRBAC

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE NANTES

<120> NOUVEAUX PEPTIDES POUR LA PREVENTION, LE DIAGNOSTIC ET LE TRAITEMENT DE  
LA LEPTOSPIROSE ANIMALE ET/OU HUMAINE

<130> VCsts004-79

<160> 1

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> peptide

<400> 1

Lys Ala Lys Pro Val Gln Lys Leu Asp Asp Asp Asp Asp Gly Asp Asp  
1 5 10 15

Thr Tyr Lys Glu Glu Arg His Asn Lys  
20 25

DÉPARTEMENT DES BREVETS

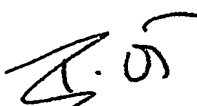
26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

**DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S)** Page N° 1../2..  
(À fournir dans le cas où les demandeurs et  
les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 @ W / 270601

<b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b>		VCstsF004/79FR
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		02 13585
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum)		
PEPTIDES POUR LA PREVENTION, LE DIAGNOSTIC ET LE TRAITEMENT DE LA LEPTOSPIROSE ANIMALE ET/OU HUMAINE		
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b>		
VIRBAC ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE NANTES		
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b>		
<input checked="" type="checkbox"/> 1	Nom	ANDRE FONTAINE
	Prénoms	Geneviève
	Adresse	Rue
		63 boulevard Port Mulon
		Code postal et ville
		14 14 3 9 10   NORT SUR ERDRE
	Société d'appartenance (facultatif)	
<input checked="" type="checkbox"/> 2	Nom	CHATRENET
	Prénoms	Benoît
	Adresse	Rue
		5 impasse de l'Assomption
		Code postal et ville
		10 16 1 10 10   NICE
	Société d'appartenance (facultatif)	
<input checked="" type="checkbox"/> 3	Nom	BRANGER
	Prénoms	Christine
	Adresse	Rue
		La Ville Bachelier
		Code postal et ville
		14 14 1 2 10   VERTOU
	Société d'appartenance (facultatif)	
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
<b>DATE ET SIGNATURE(S)</b>		
<del>DU (DES) DEMANDEUR(S)</del>		
<b>OU DU MANDATAIRE</b>		
(Nom et qualité du signataire)		
ORES Béatrice N° 92-4046		
Paris, le 7 avril 2003 		





DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11235\*03

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2../2..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 113 0 W / 270601

<b>V s références pour ce dossier (facultatif)</b>		VCstsF004/79FR
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		02 13585
<b>TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)</b> PEPTIDES POUR LA PREVENTION, LE DIAGNOSTIC ET LE TRAITEMENT DE LA LEPTOSPIROSE ANIMALE ET/OU HUMAINE		
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b>  VIRBAC ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE NANTES		
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b>		
<b>1</b>	Nom	AUBERT
	Prénoms	André
Adresse	Rue	Le Domaine Valmet 1000 chemin des Rastines
	Code postal et ville	06 100 ANTIBES
Société d'appartenance (facultatif)		
<b>2</b>	Nom	
	Prénoms	
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
<b>3</b>	Nom	
	Prénoms	
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
<b>DATE ET SIGNATURE(S)</b> <del>DU (DES) DEMANDEUR(S)</del> Paris, le 7 avril 2003 <del>DU MANDATAIRE</del> (Nom et qualité du signataire )  ORES Béatrice N° 92-4046		

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

PCT Application  
**FR0303154**

